

DIE WIRKUNG VON CALZIUM-IONEN AUF DIE
REGULATION DES GLYKOGENSTOFFWECHSELS UND DES
BLUTKREISLAUFS IN DER SPÄTEMBRYONALEN PHASE DES
HÜHNERKÜKENS (GALLUS DOMESTICUS)

Thomas Bischofberger

Disbui. München

1989

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. J. Wittmann

DIE WIRKUNG VON CALZIUM-IONEN AUF DIE
REGULATION DES GLYKOGENSTOFFWECHSELS UND DES
BLUTKREISLAUFS IN DER SPÄTEMBRYONALEN PHASE DES
HÜHNERKÜKENS (GALLUS DOMESTICUS)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Thomas Bischofberger
aus
Altusried

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr.habil. J. Wittmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Förster

Tag der Promotion: 28. Juli 1989

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Allgemeiner Teil	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Der Glykogenstoffwechsel	2
1.2.1. Die Bedeutung des Glykogenstoffwechsels für den Gesamtstoffwechsel	6
1.3. Die Sauerstoffversorgung des Vogels in der späten Phase der Embryogenese	7
1.4. Der molekularbiologische Wirkungsmecha- nismus der Katecholamine und ihre Funktion beim Vogelembryo	10
1.5. Die Umstellung des Blutkreislaufs in der pränatalen Phase	14
1.6. Die Rolle von Calcium-Ionen bei der Regulation des Blutkreislaufs	16
1.7. Zielsetzung	19
2. Charakterisierung der eingesetzten Substanzen	20
2.1. Noradrenalin	20
2.2. Calcium	20
2.3. Calcium-Ionophor (A 23187)	20

	Seite
2.4. Nifedipin	20
2.5. Adenosin	22
3. Material und Methoden	24
3.1. Reagentien	24
3.2. Versuchstiere	24
3.3. Applikation der Substanzen	25
3.4. Aufbereitung des Blutes für die Laktat- und Glucose-Bestimmung	27
3.5. Aufbereitung von Leber und Dottersack- membran für die Glykogen-Bestimmung	28
3.6. Bestimmung von Hämoglobin aus Lunge, Niere und Leber	29
a) Niere und Lunge	29
b) Leber	30
3.7. Proteinbestimmung	30
3.8. Bestimmung von ATP in der Leber	30
3.9. Bestimmung des Calziumgehaltes der Leber	31
3.10. Bestimmung der Blutgase	32
3.11. Messung des Blutdruckes	32
3.12. Statistische Berechnung	33

	Seite
4. Ergebnisse	34
4.1. Die Auswirkung von Noradrenalin auf den Glykogengehalt von Leber und Dottersackmembran	34
4.2. Der Einfluß verschiedener Substanzen auf den Glykogenstoffwechsel, die Blutzirkulation und die Blutgase	36
4.2.1. Calciumchlorid	36
4.2.2. Calcium-Ionophor (A 23187)	45
4.2.3. Nifedipin	51
4.2.4. Adenosin	60
4.2.4.1. Die Wirkung von Adenosin auf den Blutdruck	63
5. Diskussion	68
6. Zusammenfassung	75
7. Summary	78
8. Literaturverzeichnis	81

1. ALLGEMEINER TEIL

1.1. Einleitung

Ähnlich wie der Säugerembryo gewinnt auch der Hühnerembryo seine Energie vor allem aus dem Fett- und Kohlenhydratabbau.

Beim Säuger erfolgt die Versorgung mit diesen Substanzen bekanntlich über die Plazenta. Dadurch ist es für ihn nicht notwendig, besondere Energiereserven anzulegen. Der Vogelembryo dagegen entwickelt sich vollkommen getrennt vom Muttertier. Seine Nahrungskomponenten erhält er aus dem Ei. Es sind vor allem Lipide und Proteine. Die geringen Kohlenhydrat-Reserven werden schon in der ersten Inkubationswoche verbraucht (22). Deshalb muß der Vogelembryo, im Gegensatz zum Säugerembryo, schon sehr früh mit der Neusynthese von Glucose beginnen.

Über diesen Stoffwechselweg wird mehr Glucose zur Verfügung gestellt als der Embryo verbraucht. Der nicht benötigte Rest wird in Form von Glykogen in der Leber, im Dottersack und in der Muskulatur gespeichert. Diese Glykogenreserven werden gegen den Schlupf zu, noch deutlich in der pränatalen Phase, abgebaut. Ungeklärt ist, warum die Glykogenolyse zu diesem Zeitpunkt induziert wird. Neuere Befunde deuten darauf hin, daß die

Sauerstoffversorgung dabei eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang kommt auch den Katecholaminen eine wichtige Funktion zu. Sie werden in der Hypoxie vermehrt ausgeschieden und sind an der Auslösung der Glykogenolyse beteiligt. Damit erhebt sich die Frage, über welchen Mechanismus die Glykogenolyse beim Vogelembryo eingeleitet wird. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wobei dem Calcium besondere Aufmerksamkeit geschenkt wurde.

1.2. Der Glykogenstoffwechsel

Der Glykogenstoffwechsel wird seit langem intensiv untersucht. Das bisher entwickelte Schema über dessen Regulierung zeigt eine enge Verflechtung zwischen Glykogensynthese und -abbau (33).

Die Synthese setzt mit der Phosphorylierung der Glucose unter ATP-Verbrauch und Aktivierung mit Uridintriphosphat unter Austritt von Pyrophosphat ein. Durch die Glykogen-Synthetase werden die so vorbereiteten Glucose - Moleküle zu verzweigten Ketten verbunden. Dabei entsteht das Makromolekül Glykogen mit einem Molekulargewicht von bis zu mehreren 100 Millionen Dalton.

Die für die Glykogen-Synthese benötigte Glucose wird, wie eingangs erwähnt, beim Vogelembryo über die Glu-

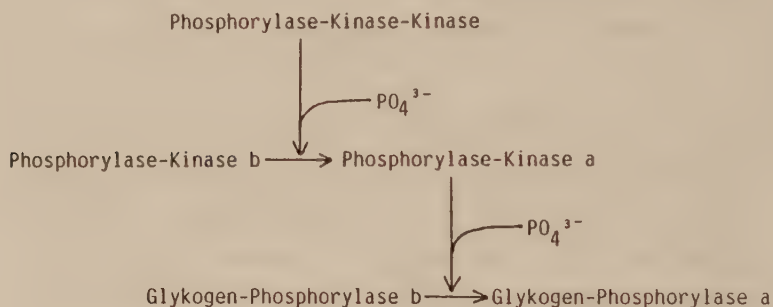
coneogenese aufgebaut.

Der Abbau der Glykogenkette erfolgt durch die Glykogen-Phosphorylase über die Anlagerung von anorganischem Phosphat unter Bildung von Glucose-1-Phosphat. Ein weiteres Enzym, die Glucose-Phosphat-Mutase, katalysiert die Umwandlung in Glucose-6-Phosphat. Nach hydrolytischer Abspaltung des Phosphatrestes durch die Glucose-6-Phosphatase liegt die freie Glucose vor und wird in den Blutkreislauf abgegeben.

Die für die Steuerung des Glykogenstoffwechsels entscheidenden Enzyme sind die Glykogen-Synthetase (Glykogen-Synthese) bzw. die Glykogen-Phosphorylase (Glykogenolyse). Aktivierung bzw. Hemmung dieser Enzyme erfolgen durch Interkonvertierung, die durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung zustande kommt. Die Glykogen-Phosphorylase wird durch Phosphorylierung aktiviert und durch Dephosphorylierung inaktiviert, während umgekehrt die Glykogen-Synthetase durch Phosphorylierung inaktiviert und durch Dephosphorylierung aktiviert wird. Dadurch wird ermöglicht, daß Effektoren gleichzeitig auf die Glykogen-Synthese und die Glykogenolyse einwirken können. Die aktivierte Form der Glykogen-Phosphorylase wird auch als Phosphorylase a bezeichnet, die inaktivierte Form als Phosphorylase b, wobei die Benennung "inaktiviert" nicht ganz zutreffend ist, da in Gegenwart einer erhöhten AMP-Kon-

zentration auch bei der Phosphorylase b katalytische Aktivität meßbar ist (29).

Die Aktivierung und Inaktivierung dieser glykogenauf- und -abbauenden Enzyme wird ebenfalls durch ein Enzymsystem reguliert. Die Enzymkaskade für den Abbau des Glykogens, die in dieser Arbeit interessiert, läßt sich wie folgt darstellen:



Umgekehrt wird die Inaktivierung der Glykogen-Phosphorylase durch eine Phosphorylase-Phosphatase unter Phosphat-Abspaltung bewirkt.

Um diese hemmenden und aktivierenden enzymatischen Reaktionen in Gang zu bringen, sind intrazelluläre Effektoren vorhanden. Sehr gut untersucht ist hierbei das cyclo AMP. Dieser Effektor wird durch das membranständige Enzym Adenylat-Cyclase aus ATP synthetisiert (29) und aktiviert selbst die Phosphorylase-Kinase-Kinase.

Um eine Verbindung zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum herzustellen bzw. um Informationen von höher geordneten Zentren in die Zelle weiterzuleiten, sind in die Zellmembran Rezeptoren eingebaut. Über diese Rezeptoren ausgelöste Signale bewirken letztlich die Aktivierung der Adenylat-Cyclase. Es gibt eine Reihe von Substanzen, z.B. Adrenalin (29), Adenosin (30) und Glucagon (46), die die Glykogenolyse auf diese Weise auslösen.

Ein weiterer Effektor, der den Abbau des Glykogens reguliert, ist das Calcium (05, 20, 29, 34). Seine Wirkung kommt durch die sogenannten α -Adrenozeptoren zustande, die durch Noradrenalin und in höherer Konzentration auch durch Adrenalin erregt werden (41). Es wird die Meinung vertreten, daß Calcium an Calmodulin, ein intrazelluläres Protein, gebunden wird; der so entstandene Calcium-Calmodulin-Komplex ist dann in der Lage, die Phosphorylase-Kinase b zu aktivieren (16). Über den genauen Ablauf bestehen allerdings noch Unklarheiten.

Dem Calcium kommt bei der glykogenolytischen Wirkung von Vasopressin (29), Angiotensin II (13) und Noradrenalin (29) eine Bedeutung zu.

Seit langem ist bekannt, daß die Glykogenolyse bei Sauerstoffmangel einsetzt. Der Mechanismus ist bis

heute letztlich nicht geklärt. Möglicherweise spielen hier Phosphat-Ionen eine Rolle, deren Konzentration sich unter Hypoxie erhöht (50). Phosphat-Ionen hemmen die Phosphorylase-Phosphatase; dadurch wird die Inaktivierung der Glykogen-Phosphorylase a gehemmt und somit der Glykogenstoffwechsel zugunsten der Glykogenolyse verschoben.

1.2.1. Die Bedeutung des Glykogenstoffwechsels für den Gesamtstoffwechsel

Die Glykogenreserven werden immer dann abgebaut, wenn der Organismus schnell Energie bereitzustellen hat oder Sauerstoff nicht in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Die Mobilisierung des Glykogens erfolgt bei Hunger, großer Anstrengung oder einer auszehrenden Krankheit und schließlich auch in der perinatalen Phase. Im Verlauf der Geburt wird durch die Abtrennung des Embryos vom Muttertier die Versorgung mit Sauerstoff und Energie unterbrochen. Beim Säuger entsteht diese Situation mit dem Abreißen der Nabelschnur. Damit wird er gezwungen, seinen Gasaustausch über die Einleitung der Lungenatmung aufrechtzuerhalten und seine Energieversorgung durch den Abbau von Reservestoffen zu bestreiten. Bei oviparen Spezies ist eine ganz andere Situation gegeben. Dennoch gibt es auch eine Reihe von analogen Vorgängen, auf die später eingegangen wird.

Die aus dem Muskel-Glykogen freigesetzte Glucose dient in erster Linie der Versorgung des Muskels selbst. Dort sind daher auch die Bedingungen geschaffen, damit freigesetzte Glucose direkt in der Muskelzelle abgebaut werden kann. Hingegen ist das in der Leber gespeicherte Glykogen für den Gesamtorganismus vorgesehen; es wird über die Blutbahn den übrigen Organen zugeführt. Der weitere Abbau der Glucose wird in der Weise verhindert, daß Glucose-6-Phosphat über die Glucose-6-Phosphatase dephosphoryliert wird (33).

1.3. Die Sauerstoffversorgung des Vogels in der späten Phase der Embryogenese

Hinsichtlich der Sauerstoffversorgung kommt es beim Vogel in der Endphase der Embryogenese zu nachhaltigen Veränderungen. Der Hühnerembryo wird bis zum 19./20. Inkubationstag über die Chorioallantoismembran mit Sauerstoff versorgt (14). Diese Membran kleidet die Schalenhaut auf ihrer gesamten Oberfläche von innen aus und ist stark von Blutgefäßen durchsetzt. Hinsichtlich des Gasaustausches übernimmt sie die Funktion der Plazenta beim Säuger (53).

Über Diffusion durch die Poren der Eischale und durch die Schalenhaut wird das Blut mit Sauerstoff angereichert. Über die Venae umbilicales gelangt es in den Embryo, wo ein Teil in die Leber, der Rest über den

Ductus venosus in die Vena cava caudalis gelangt. Dort vermischt sich das sauerstoffreiche Blut mit sauerstoffarmem Blut aus der hinteren Körperhälfte und fließt zum rechten Vorhof. Der größte Teil des Blutes gelangt von der Arteria pulmonalis über den Ductus arteriosus direkt in die Aorta descendens, da das Lungengefäßsystem dem Blutstrom einen großen Widerstand entgegensetzt. Das sauerstoffarme Blut wird über die Arteria umbilicalis zur Chorioallantoismembran geleitet, wo das darin angereicherte CO_2 nach außen abgegeben wird (53).

Mit zunehmendem Alter erhöht sich der Sauerstoffbedarf des Hühnerembryos und erreicht schließlich um den 17./18. Tag den maximalen Wert (44). Andererseits wird die Menge des einströmenden Sauerstoffs durch die Porenfläche und die Schalendicke limitiert (45). Damit ist die Gefahr gegeben, daß der Sauerstoffbedarf des Embryos nicht mehr in vollem Umfang gedeckt werden kann. Eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung wird zunächst dadurch erreicht, daß sich die Erythrozytenzahl, der Hämoglobingehalt sowie die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins erhöht (19, 47, 55). Eine sich langsam einstellende Hypoxie kann allerdings im weiteren Verlauf nicht verhindert werden (44). Darauf weisen Blutparameter in dieser Entwicklungsphase hin (19). So kommt es zu einem Abfall des pO_2 und zu einem Anstieg des pCO_2 . Die Folge dieser zunehmenden Sauer-

stoffmangelversorgung ist, daß der Embryo am 20. Inkubationstag mit dem Schnabel die innere Schalenhaut durchstößt, in die Luftkammer eindringt und mit der Lungenatmung beginnt. Die Einleitung der Lungenatmung vollzieht sich jedoch nicht schlagartig wie beim Säuger, bei dem diese nach dem Abreißen der Nabelschnur sofort einsetzen muß. Vielmehr ist beim Vogel zunächst noch ein Nebeneinander von Lungen- und Chorioallantoisatmung zu beobachten, wobei die erstere immer mehr zu-, die letztere immer mehr abnimmt, bis schließlich die Lunge vollständig ventiliert bzw. die Chorioallantoisgefäße vollständig obliteriert sind. Diese Entwicklung erstreckt sich beim Hühnerembryo über etwa 24 Stunden. Innerhalb dieser Zeit kommt es zu einem CO_2 -Anstieg und einem O_2 -Abfall in der Luftkammer. Aus diesem hypoxischen Zustand rettet sich der Embryo dadurch, daß er mit dem sogenannten Eizahn die Eischale anpickt und sich so einen direkten Zugang zur Außenwelt verschafft. Diese Erkenntnis geht auf die Versuche von Visschedijk (58, 59) zurück, der den Gasaustausch durch die Eischale im Bereich der Luftkammer dadurch verhinderte, daß er hier die Eischale mit Paraffin überzog. Als Folge davon kam es zu einem vorzeitigen Anpicken der Eischale.

Vergleicht man diese Situation mit der des Säugers, so erkennt man, daß sich in beiden Fällen zum Ende der pränatalen Phase hin eine Hypoxie ausbildet. Diese

entsteht beim Säuger, wie bereits angedeutet, fast augenblicklich nach dem Reißen der Nabelschnur; beim Vogel hingegen entwickelt sie sich allmählich, bedingt durch die begrenzte Gasaustauschkapazität der Eischale einerseits und die zunehmende Körpergröße andererseits.

Sowohl beim Säuger als auch beim Vogel kommt es in dieser hypoxischen Phase zur Einleitung der Lungenatmung, deren vollständige Entwicklung sich beim Vogel allerdings über mehrere Stunden erstreckt. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Vogel und Säuger ist darin gegeben, daß beim Vogel die Ausbildung der Hypoxie nicht in der perinatalen, sondern noch deutlich in der pränatalen Phase abläuft. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß beim Hühnerembryo auch die Glykogenolyse zu diesem Zeitpunkt, nämlich um den 19. Tag, einsetzt. In der Literatur wird die Meinung vertreten, daß auf diese Weise für das ZNS Glucose bereitgestellt wird, die die Funktion des Gehirns fördert, sodaß der Vogel in der Lage ist, selbständig den Schlupfvorgang durchzuführen (18).

1.4. Der molekularbiologische Wirkungsmechanismus der Katecholamine und ihre Funktion beim Vogelembryo

Über Katecholamine kann, wie bereits ausgeführt wurde, die Glykogenolyse eingeleitet werden. Im folgenden

soll daher auf ihre Wirkungsweise näher eingegangen werden.

Die natürlich vorkommenden Katecholamine, Adrenalin und Noradrenalin, entfalten ihre Wirkung über zellmembrangebundene Rezeptoren, die Adrenozeptoren. Diese Rezeptoren sind auf Zellen mit sehr unterschiedlichen Funktionen lokalisiert (z.B. Gefäß- und Herzmuskelzellen, Leberzellen, Pancreaszellen). Daraus erklärt sich die hohe Wirkungsvielfalt der Katecholamine (41).

Man unterscheidet 2 Arten von Adrenozeptoren, die α - und β -Adrenozeptoren (01). Die ersteren werden insbesondere durch Noradrenalin und auch durch hohe Konzentrationen von Adrenalin erregt, die letzteren durch niedrigere Adrenalinkonzentrationen (41). Dies führt dazu, daß die Katecholamine selbst an ein und derselben Zelle unterschiedliche Effekte auslösen können. Die Weitergabe der Information erfolgt über für beide Rezeptoren-Typen unterschiedliche Effektoren: der α -Rezeptor bewirkt einen verstärkten Calcium-Influx in die Zelle, der β -Rezeptor aktiviert die membrangebundene Adenylatcyclase, die die Bildung von cyclo AMP aus ATP katalysiert. Es können also zwei Effektoren in der Zelle angereichert werden, nämlich Calcium und cyclo AMP (41). Über beide kann die Glykogenolyse eingeleitet werden (05, 29).

Das sich aus ektodermalen Zellen entwickelnde Nebennierenmark stellt in der späteren Inkubationsphase den Hauptsyntheseort für die Katecholamine dar; dort werden sie in intrazellulären Granula gespeichert. Ein geringer Teil des Noradrenalin stammt aus den Endaufzweigungen der postganglionären adrenergen Nervenendigungen. Das Substrat für die Katecholamin-Synthese stellt die Aminosäure Tyrosin dar. Über Dopa und Dopamin wird daraus Adrenalin bzw. Noradrenalin gebildet. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym ist hierbei die Tyrosinhydroxylase (38), die Tyrosin zu Dopa hydroxyliert. Der Abbau der Katecholamine erfolgt über die Katechol-O-Methyltransferase (COMT) bzw. die Monoaminooxidase (MAO).

Die Freisetzung der Katecholamine wird sowohl durch neuronale, als auch durch hormonale Einwirkung gesteuert. In Bezug auf das Nervensystem spielt hierbei der Sympathikus die zentrale Rolle. Über die Sekretion von Acetylcholin wirkt er auf die n-Cholinorezeptoren der katecholaminspeichernden Zellen des Nebennierenmarks; diese geben daraufhin die Katecholamine frei. An der hormonalen Aktivierung der Katecholaminfreisetzung sind Angiotensin II, Prolaktin und Vasopressin beteiligt (11, 21, 26, 42, 48).

Da im pränatalen Leben die vegetative Innervation des Nebennierenmarks noch nicht vollständig entwickelt

ist, stehen in dieser Zeit die nicht-neuronalen Steuerungsmechanismen im Vordergrund.

Lange Zeit gab es keine eingehenden Studien über die Funktion der Katecholamine beim Vogel in der prä- und perinatalen Phase. Bekannt war lediglich, daß die für die Inaktivierung der Katecholamine wichtigen Enzyme, MAO und COMT, gegen Ende der Inkubation stark veränderte Aktivität zeigen (32), was auf einen intensiven Katecholaminstoffwechsel hinweist.

In neuerer Zeit hat sich Prechtel (43) mit der Funktion der Katecholamine im Schlupfgeschehen beschäftigt. Dabei konnte er zeigen, daß der Serumkanalaminpiegel sein Maximum am 19. Tag erreicht, also zu einem Zeitpunkt, zu dem die Sauerstoffversorgung des Embryos stark erniedrigt ist. Dies legte den Schluß nahe, daß die Katecholamin-Sekretion über die Hypoxie gesteuert wird. Dieser Zusammenhang konnte dann tatsächlich auch mit Hilfe einer vorzeitig ausgelösten Hypoxie aufgezeigt werden.

Ein weiterer wichtiger Befund dieser Arbeit war, daß der Beginn der Glykogenolyse mit der Zunahme der Katecholamin-Konzentration im Serum einhergeht. Dies führte zu der Vermutung, daß die Katecholamine beim Hühnerembryo an der Auslösung der Glykogenolyse beteiligt sind. Schließlich zeigte Prechtel (43), daß

exogen zugeführte Katecholamine eine Verbesserung des Gasaustausches zur Folge haben. Sie kommt offensichtlich über die Einwirkung auf den Kreislauf zustande.

Insgesamt zeigen diese Befunde, daß die Katecholamine in der kritischen Phase, die die Umstellung von der Chorioallantoisatmung auf die Lungenatmung darstellt, die Bereitstellung von Glucose und Sauerstoff unterstützen und so wesentlich zur Sicherung des Überlebens beitragen.

1.5. Die Umstellung des Blutkreislaufs in der prä-natalen Phase

Zusammen mit der Einleitung der Lungenatmung vollziehen sich beim Embryo auch wesentliche Veränderungen im Kreislaufgeschehen. Auch hier kommt den Katecholaminen eine wichtige Funktion zu. Bei der Auslösung dieser vasoaktiven Wirkung spielen auch die Calzium-Ionen eine wichtige Rolle. Hierauf wird in Punkt 1.6. näher eingegangen.

Daneben ist auch ein anderer Mechanismus für die Kreislaufregulation von Bedeutung, nämlich das Kallikrein-Kinin-System (62). Der Regelmechanismus dieses Systems funktioniert folgendermaßen: Kallikrein katalysiert die Umwandlung von Kininogen zu Bradykinin, welches wiederum durch ein weiteres Enzym, das Angio-

tensin converting enzyme (ACE), inaktiviert wird. ACE ist in der Lunge an der Oberfläche der Gefäßendothelzellen lokalisiert, während Bradykinin intrazellulär vorkommt. Die Aufgabe dieser vasoaktiven Substanz besteht darin, den pulmonalen Gefäßwiderstand zu verringern. Über eine Kallikrein-Zunahme um den 18./19. Tag wird so beim Hühnerembryo eine vermehrte Lungendurchblutung gewährleistet. Ein dadurch möglicher vorzeitiger Verschuß des Ductus arteriosus wird durch einen gleichzeitigen Anstieg von ACE verhindert. Im weiteren Verlauf der Entwicklung steigt die Kallikrein-Konzentration stetig an, während das ACE einen konstanten Wert beibehält. Dadurch nimmt die Lungendurchblutung immer mehr zu. Andererseits verringert sich der Blutfluß durch den Ductus arteriosus, bis dieser schließlich obliteriert.

Der Wirkungsmechanismus von Bradykinin ist bis heute nicht geklärt. Es wird die Auffassung vertreten, daß seine Wirkung in Verbindung mit den Prostaglandinen zustande kommt (39), die, wie man weiß, weitreichende vasoaktive Eigenschaften besitzen. So beeinflussen sie u.a. auch den Schließmechanismus des Ductus arteriosus (37).

1.6. Die Rolle von Calcium-Ionen bei der Regulation des Blutkreislaufs

Bekanntlich dient Calcium in der Muskelzelle als wichtiger Effektor für die Auslösung der Kontraktion. Im Zusammenhang mit dem Blutkreislauf verdient die Wirkung des Calciums auf die glatte Gefäßmuskulatur besondere Beachtung. In dieser Muskelgruppe ist laut Walsh und Hartshorne (60) die Phosphorylierung von Myosin für das Zustandekommen einer Kontraktion von zentraler Bedeutung. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, ist die Myosin light chain kinase (MLCK). Zur Aktivierung der MLCK werden zwei Komponenten benötigt, nämlich Calcium-Ionen und ein Calcium-bindendes, intrazelluläres Protein, das Calmodulin.

Dabrowska et al. (08, 09, 10) haben zum ersten Mal die unbedingte Notwendigkeit von Calmodulin für die Aktivierung der MLCK in der Muskulatur des Hühnermagens nachgewiesen. Dabei ist der Calcium-Calmodulin-MLCK-Komplex als funktionelle Einheit anzusehen.

Entscheidend für die Regulation der Myosin-Phosphorylierung ist, daß bei niedriger Calcium-Konzentration die Verbindung zwischen MLCK und Calmodulin gelöst wird (60). Dies führt zur Inaktivierung der MLCK und damit letztlich zur Muskelrelaxation. Umgekehrt wird bei hoher Calcium-Konzentration die Bildung des Cal-

zium-Calmodulin-MLCK-Komplexes gefördert, was einer Aktivierung der MLCK und damit einer Steigerung der Kontraktionsfähigkeit gleichkommt.

Für die Regulation der Calzium-Konzentration in der Gefäßmuskelzelle sind die sogenannten Calziumkanäle von großer Bedeutung. Nach Stanfield (52) stellen sie große, membranüberbrückende Glykoprotein-Moleküle dar. Sie gestatten einen kontrollierten Calziumeinstrom in die Zelle. Der Öffnungsmechanismus ist abhängig vom Membranpotential. Je höher der Grad der Depolarisation, um so durchlässiger wird der Kanal. Andererseits scheint der Verschluss des Kanals nicht nur vom Membranpotential, sondern auch von der Calzium-Akkumulation in der Zelle abzuhängen (15). Braunwald (06) beschreibt darüber hinaus sogenannte rezeptorgesteuerte Calziumkanäle. Diese kommen in der Herz- und Gefäßmuskelzelle vor. Im Sarkolemm der Myocardzelle werden diese Kanäle über die Erregung der β_1 -Rezeptoren geöffnet, in der Gefäßmuskelzelle über die α -Rezeptoren. In beiden Fällen wird dadurch die intrazelluläre Calzium-Konzentration erhöht. Andererseits existieren auch Mechanismen, das Calzium wieder aus der Zelle auszuschleusen. So wird in der Gefäßmuskelzelle über Erregung der β -Rezeptoren die cyclo AMP-Konzentration erhöht. Dadurch wird eine Proteinkinase aktiviert, die den Efflux von Calzium steigert und gleichzeitig den Influx hemmt (06). Die Myocardzelle verfügt über eine

Calzium-ATPase, die in einem energieverbrauchenden Prozeß Calzium aus der Zelle ausschleust (06).

1.7. Zielsetzung

Wie aus dem allgemeinen Teil hervorgeht, vollziehen sich beim Vogelembryo gegen Ende der Brutzeit tiefgreifende Veränderungen hinsichtlich der Sauerstoffversorgung, des Energiehaushaltes und des Blutkreislaufs. Aus den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten läßt sich erkennen, daß diese Veränderungen in einem engen Zusammenhang zueinander stehen. Eine zentrale Rolle spielen hierbei offensichtlich die Katecholamine.

Es stellte sich nun die Frage, welche Effektoren die von den Katecholaminen ausgehende Information in der Zelle weiter umsetzen. Dies wurde anhand des Glykogenstoffwechsels untersucht, wobei die Wirkung der Katecholamine über das Calcium im Vordergrund stand.

Neben den Calcium-Ionen wurden in diesem Zusammenhang auch ein Calcium-Ionophor und ein Calciumkanal-Blocker (Nifedipin) eingesetzt. Vergleichend hierzu wurde schließlich mit Adenosin eine Substanz ausgewählt, deren Wirkung nicht über Calcium-Ionen zustande kommt.

2. CHARAKTERISIERUNG DER EINGESETZTEN SUBSTANZEN

2.1. Noradrenalin

Dieses Katecholamin wurde den Embryonen in der L-Form appliziert.

2.2. Calcium

Es wurde in Form von Calciumchlorid eingesetzt.

2.3. Calcium-Ionophor (A 23187)

Hierbei handelt es sich um eine Substanz, die in der Lage ist, die Durchlässigkeit biologischer Membranen für Calcium-Ionen zu erhöhen. So konnte in einem in vitro - Versuch in Anwesenheit von extrazellulärem Calcium mit Hilfe von A 23187 die Aktivität der Glykogen-Phosphorylase von Leberzellen um das 3-4 fache gesteigert werden (20), während in dem gleichen Versuch ohne extrazelluläres Calcium kein Effekt zu erzielen war. Dies bedeutet, daß die Aktivitätserhöhung der Glykogen-Phosphorylase auf eine gesteigerte Calcium-Durchlässigkeit der Zellmembran zurückzuführen ist.

2.4. Nifedipin

Bei dieser wasserunlöslichen Substanz handelt es sich

um ein Dihydropyridin-Derivat (49, 57). Sie wird der Gruppe der "Calzium-Kanal-Hemmstoffe" zugeordnet und wirkt vasodilatatorisch in venösen und arteriellen Gefäßen (49). In der Humanmedizin wird sie als Anti-anginosum, Antihypertensivum und Vasodilatator eingesetzt (49).

Die Wirkungsweise von Nifedipin beruht nach Vaghy (57) darauf, daß es eine reversible Bindung mit einem zellmembran-gebundenen Rezeptor eingeht. Daraus resultiert eine Membran-Depolarisation. Damit wird die Öffnung des potentialabhängigen Calziumkanals unterbunden und der Calziumeinstrom in die Gefäßmuskelzelle vermindert. Folglich verringert sich die Kontraktionsfähigkeit. Auf diese Weise wird die Vasodilatation unterstützt.

Es liegen Hinweise dafür vor, daß die Auswirkungen von Nifedipin auf den Organismus noch komplexerer Natur sind. Wie in der Literatur mehrfach angegeben, erhöht Nifedipin den Noradrenalinblutspiegel; der Adrenalinblutspiegel wird dagegen nicht beeinflusst (07, 12, 36). Offensichtlich kommt es dadurch nicht zu einem Blutdruckanstieg, vermutlich wegen der Blockade der Calziumkanäle.

2.5. Adenosin

Es ist ein Purinnucleotid und stellt ein Zwischenprodukt beim Abbau von Adenosinmonophosphat dar.

Man schreibt ihm organspezifischen Einfluß auf den Blutdruck zu, so z.B. im Herzen, Gehirn, Skelettmuskel und Fettgewebe, wo es vasodilatatorisch wirkt (03, 25, 27); demgegenüber wird ein vasokonstriktorischer Effekt auf Niere (51) und Leber (28) beschrieben.

Der Mechanismus der Adenosin-Wirkung ist indessen noch nicht ganz geklärt. Laut Stone (54) ist ein Zusammenwirken von Adenosin mit den Katecholaminen in der Weise denkbar, daß Adenosin die Katecholamin-Wirkung auf die α - bzw. β -Rezeptoren beeinflusst. Außerdem wurde die Meinung vertreten, daß Adenosin, ähnlich wie Nifedipin, den Calziumeinstrom in die Gefäßmuskelzelle blockiert. Hierüber gibt es allerdings widersprüchliche Befunde (40).

Neben dem Blutkreislauf beeinflusst Adenosin auch den Glykogen-Stoffwechsel. Nach Hoffer (30) steigert es die Glykogenolyse in der Leber; gleichzeitig fand er eine erhöhte cyclo AMP-Konzentration in den Leberzellen. Dies hängt damit zusammen, daß in der Membran der Leberzelle adenosin-spezifische Rezeptoren existieren (30), die, ähnlich wie Adrenalin über die β -Rezep-

toren, die Adenylat-Cyclase aktivieren. So kommt die Glykogenolyse über cyclo AMP als Effektor zustande.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Reagentien

Enzyme, Coenzyme: Fa. Boehringer, Mannheim

Nifedipin, Adenosin: Fa. Sigma Chemie, Deisenhofen

Calzium-Ionophor (A 23187): Fa. Calbiochem, La Jolla, U.S.A.

Triton X-100, Noradrenalin: Fa. Serva, Heidelberg

Flüssiger Stickstoff: Fa. Messer Griesheim, Frankfurt

alle übrigen Reagentien: Fa. Merck, Darmstadt

3.2. Versuchstiere

Es wurden embryonale Küken der Weißen Leghornrasse verwendet. Die Bruteier wurden vom Gut Heinrichsruh bezogen und im hauseigenen Brüter bei 37,8°C und 63-68 % relativer Luftfeuchtigkeit bebrütet. Die bebrüteten Eier wurden in der Regel ab dem 17. Tag verwendet.

3.3. Applikation der Substanzen

Bei der Applikation der Substanzen sollten die Embryonen durch den Eingriff selbst nicht beeinträchtigt werden. Dies ist beim Vogelembryo vor allem dann gewährleistet, wenn die Substanzen in die Luftkammer injiziert werden. Dabei wird davon ausgegangen, daß die Substanzen über die Gefäße der Chorioallantoismembran in den Embryo gelangen. Ihre Resorption kann dadurch beschleunigt werden, daß die Eier für einige Zeit (ca. 2 Stunden) auf den spitzen Pol gestellt werden. Diese sehr oft angewandte Methode wurde auch in dieser Arbeit praktiziert. Es zeigte sich aber, daß die auf diese Weise applizierten Substanzen nur zum Teil eine Auswirkung auf die ausgewählten Parameter hatten. Daher wurde auch die direkte Applikation in den Embryo durchgeführt. Dies geschah folgendermaßen: Zunächst wurde das Ei durchleuchtet, um die Lage des Embryos und große Chorioallantoisgefäße zu lokalisieren, damit diese bei der nachfolgenden Öffnung des Eies geschont werden konnten. Mit einer Schere wurde nun an einer Stelle, wo der Embryo sich nahe an der Eischale befand, eine Fensterung, möglichst unter Verschonung der Schalenhaut, vorgenommen. Der Durchmesser des runden Fensters betrug etwa 1 cm. Anschließend wurde mit einer spitzen Pinzette die Schalenhaut abpräpariert. In den durch die Chorioallantoismembran erkennbaren Embryo wurde mit einer dünnen Kanüle ($\emptyset$ 0,18 mm) die

betreffende Substanz appliziert. Das Fenster wurde mit Tesafilm verschlossen und das Ei mit dem Fenster nach oben im Brüter deponiert.

Schließlich wurde bei Noradrenalin und Adenosin die Applikation in die Arteria umbilicalis durchgeführt. Das Gefäß wurde auf ähnliche Weise freipräpariert wie bei der direkten Injektion in den Embryo. Im Falle von Noradrenalin erschien diese Art der Applikation ratsam, da in der Literatur behauptet wird, daß diese Substanz pränatal nicht wirksam ist (17). Bei diesen Versuchen wurde das Katecholamin in die Luftkammer appliziert.

Adenosin wurde auch schon bei 14 Tage alten Embryonen in die Arteria umbilicalis injiziert. Es stellte sich heraus, daß bei jüngeren Embryonen die Applikation in das Gefäßsystem weniger kompliziert ist, da sich die Gefäße zu dieser Zeit bei der Punktion noch nicht so stark kontrahieren und dadurch die Zirkulation eher erhalten bleibt. Bei älteren Embryonen (17./18. Tag) machten wir dagegen wiederholt die Beobachtung, daß vor allem ab dem 18. Tag sofort nach der Punktion die Zirkulation unterbunden wurde. Eine direkte Applikation in den Embryo war am 14. Tag nur schwer durchführbar, da sich seine Fixation schwieriger gestaltete als zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt.

Bei den Versuchen wurden die Kontroll-Embryonen mit dem jeweils entsprechenden Lösungsmittel behandelt.

Die Wartezeit nach Applikation der Substanzen in die Luftkammer bzw. in den Embryo betrug 2 Stunden, während bei der intraarteriellen Applikation der Embryo bereits nach 20 Minuten untersucht wurde.

3.4. Aufbereitung des Blutes für die Laktat- und Glucose-Bestimmung

Die Gewinnung des Blutes erfolgte per Herzpunktion. Hierfür wurde der Embryo am stumpfen Eipol, ohne Verletzung von großen Blutgefäßen, aus dem Ei so weit entnommen, daß er mit der Hand fixiert und punktiert werden konnte. Mittels einer mit Heparin benetzten Kanüle wurde über die Brustapertur in das Herz eingestochen. Das so gewonnene Blut wurde in einem Reagenzglas aufgefangen und sofort im Eisbad gekühlt. Davon wurden 200 µl entnommen und mit dem gleichen Volumen 0,6 molarer Perchlorsäure versetzt. Daraufhin wurde 2 Minuten bei 6000 x g zentrifugiert und der Überstand mit Kaliumhydrogencarbonat neutralisiert (Indikator: Methylorange).

Die photometrische Messung der Laktat-Konzentration erfolgte nach der Methode von Hohorst (31), die der Glucose-Konzentration nach Bergmeyer (02). Für die

Messung wurden jeweils 25 µl Probe eingesetzt.

3.5. Aufbereitung von Leber und Dottersackmembran für die Glykogen-Bestimmung

Von beiden Organen wurden jeweils 400 mg frisch eingewogen. Die Dottersackmembran wurde zuvor in destilliertem Wasser gründlich vom Dotter gereinigt und dann mit Zellstoff getrocknet. Anschließend wurde sie in 2 ml 30 %iger KOH intensiv geschüttelt, um eine vorzeitige Glykogenolyse zu verhindern. Für die Leber war hierzu eine Homogenisierung in 30 %iger KOH nötig. Das folgende 15-minütige Kochen im Wasserbad diente der Zerstörung der Zellmembran, um das Glykogen aus den Zellen freizusetzen. Die Ausfällung des Glykogens wurde durch Zugabe von 3,5 ml Äthanol und abermaliges kurzes Aufkochen erreicht. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand dekantiert. Die hydrolytische Spaltung des Glykogens erfolgte durch zweistündiges Kochen in 2 ml 1 molarer H_2SO_4 . Mit 2 molarer NaOH wurde anschließend neutralisiert (Indikator: Methylorange) und mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt. Die Messung der Glucose-Konzentration wurde analog zur Bestimmung der Blut-Glucose durchgeführt. Von der Probe wurden 25 µl eingesetzt.

3.6. Bestimmung von Hämoglobin aus Lunge, Niere und Leber

Die Bestimmung des Hämoglobins wurde nach der Cyan-Hämoglobin-Methode (04) durchgeführt. Dabei wird Hämoglobin in Cyan-Hämoglobin übergeführt. Dessen Farbin-tensität wird photometrisch bei 546 nm gemessen.

Die Proben wurden nach der Entnahme der Embryonen aus der Eischale und der Dekapitation wie folgt behandelt:

a) Niere und Lunge:

Die Organe wurden sofort nach dem Öffnen des Abdomens entnommen und in ein Reagenzglas mit 2 ml Aqua dest. gegeben, um sie anschließend zu homogenisieren. Nach der Zentrifugation wurden vom Überstand 0,4 ml entnommen und mit 2,5 ml Hämoglobin-Reagenz versetzt.

Da sich bei der Lunge nach dem Zentrifugieren noch erhebliche Hämoglobinreste im Niederschlag befanden, wurde dieser nach dem Dekantieren des Überstandes noch einmal in 2 ml Aqua dest. aufgenommen, homogenisiert und zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt.

b) Leber:

Bei der Hämoglobin-Bestimmung in der Leber störte der hohe Lipidanteil. Dieser wurde vor der Messung entfernt. Die Bearbeitung wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde die Leber in 2 ml Aqua dest. homogenisiert. Danach wurden 0,4 ml des Homogenats mit 2,5 ml Hämoglobin-Reagenz versetzt und 30 Minuten geschüttelt. Um das enthaltene Fett in einer unpolaren Phase zu isolieren, wurden 0,1 ml Hexan zugesetzt. In der Ultrazentrifuge wurde 20 Minuten bei 17000 x g zentrifugiert, um die unpolare Lipidphase von der polaren Cyan-Hämoglobin-Schicht zu trennen. Die niedrige Temperatur in der Ultrazentrifuge führte zu einer Verfestigung der Lipidphase; so wurde einer erneuten Verunreinigung der Cyan-Hämoglobin-Schicht mit Fett entgegengewirkt. Diese wurde danach vorsichtig abpipetiert.

3.7. Proteinbestimmung

Sie wurde nach der Biuret-Methode durchgeführt (24).

3.8. Bestimmung von ATP in der Leber

Nach der Entnahme der Leber aus dem Abdomen wurde sie mit der Gefrierstoppzange gequetscht. Diese war zuvor in flüssigem Stickstoff auf -198°C abgekühlt worden.

Dadurch wurde der rasche Zerfall von ATP verhindert. Mit einem Mörser wurde die Leber anschließend in flüssigem Stickstoff pulverisiert und danach sofort gewogen. Daraufhin wurde sie in 0,6 molarer Perchlorsäure (8 ml/g Leber) mit dem Ultraturrax homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren in der Ultrazentrifuge (15 Minuten bei $2500 \times g$) wurde der Überstand dekantiert. Dieser wurde mit K_2CO_3 neutralisiert (Indikator: Methylorange).

Die photometrische Messung wurde nach Lamprecht und Trautschold (35) durchgeführt.

3.9. Bestimmung des Calciumgehaltes der Leber

Es wurden 400 mg Leber (Frischgewicht) in einen hitzebeständigen Tiegel eingewogen und 24 Stunden im Muffelofen bei $560^\circ C$ verascht. Die Asche wurde danach 2 Stunden in 25 %iger Salzsäure im Sandbad gekocht, um die Calcium-Ionen aus Peroxidbindungen, die beim Veraschen entstehen, freizusetzen. Daraufhin wurden durch Filtration mit heißem Aqua dest. die unlöslichen Aschebestandteile abgetrennt, wobei sowohl Tiegel als auch Filter, ebenfalls mit heißem Aqua dest., nachgespült wurden. Das Filtrat wurde mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt. Im Flammenphotometer wurde die Calcium-Konzentration mittels einer Acetylen-Flamme ermittelt.

3.10. Bestimmung der Blutgase

Zu diesem Zweck wurde das arterialisierte Blut aus der Vena umbilicalis entnommen. Freilegung und Punktion des Gefäßes erfolgten analog zu der in Abschnitt 3.3. beschriebenen Methode. Es wurden 200 μ l Blut mit einer auf einer 1-ml Spritze aufgesetzten Kanüle ($\emptyset$ 0,18 mm) entnommen und davon 100 μ l in eine Glaskapillare injiziert, welche an beiden Enden sogleich mit Stopfen versehen wurde. Die Blutprobe wurde in Eis gekühlt.

Die Blutgas-Analyse wurde mit dem pH/Blutgas-Analysator "Instrumentation Laboratory System 1302" durchgeführt. Dieses Gerät ist mit 3 Elektroden zur quantitativen Bestimmung des pH, $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$ in Vollblutproben ausgestattet. Aus diesen Werten berechnet es das Plasmabicarbonat und den Basenexzeß.

3.11. Messung des Blutdruckes

Diese Messung wurde an der freipräparierten Arteria umbilicalis durchgeführt. Die Freilegung erfolgte in der in Abschnitt 3.3. angegebenen Weise. Mittels einer feinen Kanüle wurde das Gefäß punktiert. Diese Kanüle war mit dem Transducer "Micron MP 20 D" gekoppelt. Über ihn wird der im Gefäß bestehende mechanische Druck in einen elektrischen Spannungswert umgewandelt, der als Meßgröße dient. Der Transducer verfügt über

einen Meßbereich von -50 bis +300 mm Hg und spricht auf eine Volumenverschiebung von $0,002 \text{ mm}^3/100 \text{ mm Hg}$ an. Die eingesetzten Substanzen wurden über einen Seitenkanal durch die Kanüle in das Gefäß injiziert. Die bei der Messung entstandenen Impulse wurden auf einem Registriergerät aufgezeichnet.

3.12. Statistische Berechnung

Die in den Tabellen und Abbildungen angegebenen Werte sind, mit Ausnahme der Werte in Tab. 01 und 18, Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen (+). Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt.

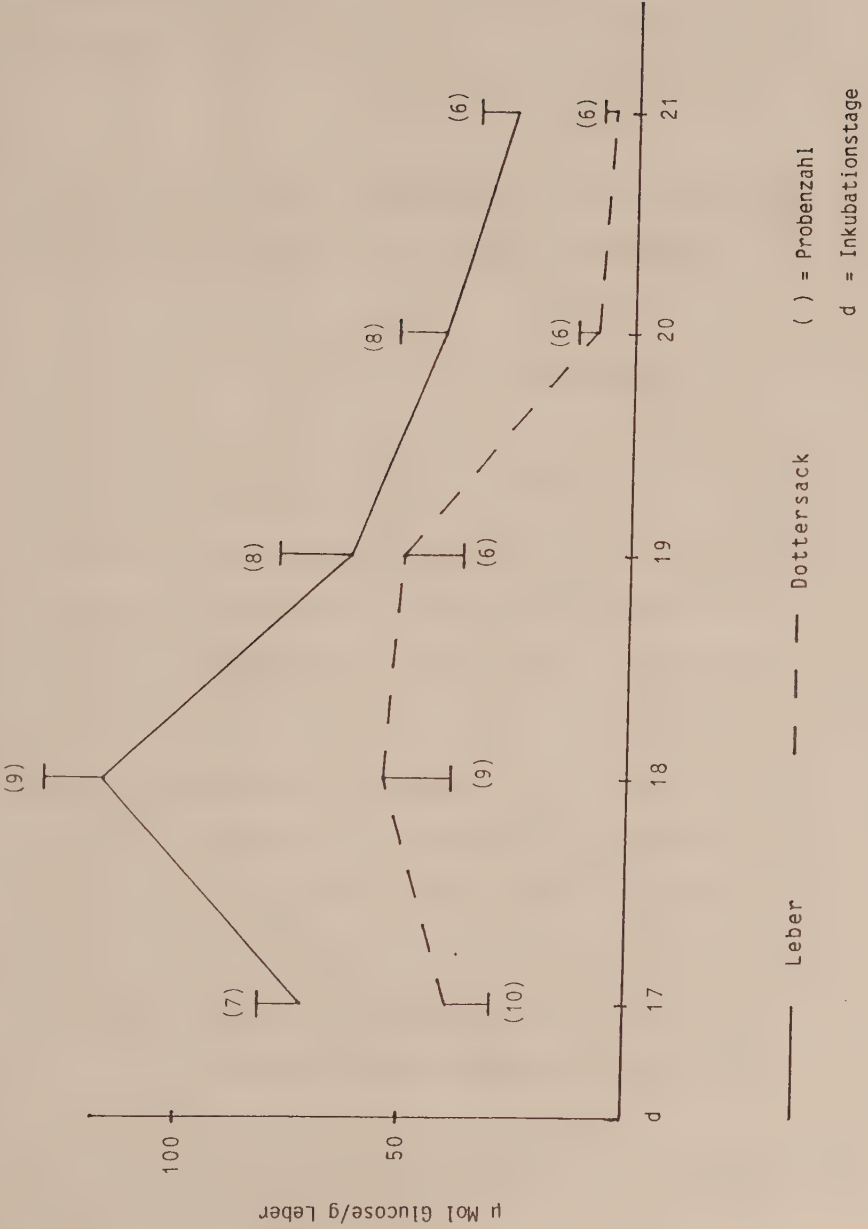
4. ERGEBNISSE

4.1. Die Auswirkung von Noradrenalin auf den Glykogen- gehalt von Leber und Dottersackmembran

In den folgenden Untersuchungen wurde die Glykogenolyse in der Leber und im Dottersack studiert. Es erschien daher sinnvoll, den Glykogengehalt dieser beiden Organe in der Endphase der Embryogenese aufzuzeigen. Wie Abb. 01' zeigt, nimmt in der Leber der Glykogengehalt bis zum 18. Tag zu und fällt anschließend steil ab. Auch im Dottersack ist ein Anstieg der Glykogenkonzentration zu beobachten. Im Gegensatz zur Leber setzt allerdings hier der Abfall erst nach dem 19. Tag ein. Weiterhin fällt auf, daß die Glykogenkonzentration in der Leber höhere Werte erreicht als im Dottersack.

Schließlich interessierte, inwieweit über Katecholamine vorzeitig in die Glykogenolyse eingegriffen werden kann. Zu diesem Zweck wurden den Embryonen 0,05-0,07 ml Noradrenalin in Form einer 0,05 millimolaren Lösung in die Arteria umbilicalis appliziert. Dieses Katecholamin wurde eingesetzt, weil es, wie im allgemeinen Teil ausgeführt, seine Wirkung vor allem über α -Rezeptoren entfaltet. Als Zeitpunkt für die Applikation wurde, wie auch bei den folgenden Substanzen, der 17. und 18. Tag gewählt, da die Glykogenolyse zu der Zeit

Abb. 01: Verlauf der Glykogen-Konzentration in der Leber und im Dottersack



noch nicht spontan eingeleitet wird. Es zeigte sich, daß sich innerhalb von 20 Minuten der Glykogengehalt in der Leber deutlich verringerte. Demgegenüber verursachte Noradrenalin im Dottersack keine Veränderung des Glykogengehaltes (Tab. 01).

4.2. Der Einfluß verschiedener Substanzen auf den Glykogenstoffwechsel, die Blutzirkulation und die Blutgase

4.2.1. Calciumchlorid

Nachdem über Noradrenalin die Glykogenolyse in der Leber ausgelöst werden konnte, wurde als nächstes untersucht, ob über die Applikation von Calcium-Ionen ein ähnlicher Effekt bewirkt werden kann. Es wurden 0,05 ml einer 0,54 molaren Calciumchlorid-Lösung zunächst in die Luftkammer appliziert. Da man davon ausgehen mußte, daß die Resorption der Calcium-Ionen aus der Luftkammer eine längere Zeit beansprucht, wurden die Embryonen, wie bereits in Abschnitt 3.3. erläutert, erst 2 Stunden nach der Applikation untersucht. Hierbei wurde sowohl der Glykogengehalt der Leber als auch der Laktat- und Glucoseblutspiegel bestimmt. Es konnte jedoch keine Veränderung der ausgewählten Parameter festgestellt werden (Tab. 02 und 03).

Damit war die Vermutung naheliegend, daß die Calcium-

Tab. 01: Der Glykogengehalt von Leber und Dottersack nach Applikation von Noradrenalin
in die Arteria umbilicalis (nur Einzelwerte angegeben)

d	17			18		
	Leber	Dottersack		Leber	Dottersack	
	μ Mol Glucose/g					
Kontrolle	44,2	29,7		87,8	38,2	
Noradrenalin	31,2	32,3		49,2	41,2	
	19,8	30,2		32,8	43,9	

d = Inkubationstage

Tab. 02: Der Glykogengehalt der Leber nach Applikation von Calciumchlorid
in die Luftkammer

d	17	18
	μ Mol Glucose/g Leber	
Kontrolle	$76,7 \pm 10,4$	$113,0 \pm 13,6$
n	(7)	(5)
CaCl ₂	$74,4 \pm 8,3$	$112,8 \pm 15,8$
n	(6)	(6)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

Tab. 03: Der Serumlaktat- und Serumglucosespiegel nach Applikation von Calciumchlorid in die Luftkammer

d	17		18	
	Laktat	Glucose	Laktat	Glucose
	mg/100 ml			
Kontrolle	6,9 ± 0,35	120,1 ± 7,9	6,5 ± 1,3	123,4 ± 3,8
n	(7)	(7)	(5)	(6)
CaCl ₂	5,9 ± 1,5	121,5 ± 9,3	5,6 ± 1,3	122,9 ± 7,7
n	(6)	(6)	(6)	(7)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

Ionen den Embryo über, die Luftkammer nicht erreicht hatten. Deswegen wurde in einer weiteren Versuchsreihe das Calciumchlorid in der oben angegebenen Dosierung in den Embryo appliziert. Doch auch dies führte nicht zu einer meßbaren Reaktion der Embryonen (Tab. 04 u. 05). Schließlich interessierte die Frage, ob das applizierte Calcium zu einer Erhöhung des Calciumgehaltes in der Leber führte. Daher wurde auch noch die Calcium-Konzentration in der Leber bestimmt. Aus Abb. 02 ist zu ersehen, daß die Leber der behandelten Embryonen einen zwar geringen, aber signifikanten Anstieg der Calcium-Ionen-Konzentration aufwies.

Die darüber hinaus durchgeführte Untersuchung der Glykogenolyse im Dottersack ergab, daß auch dort die Verabreichung von Calcium-Ionen keinen Effekt auslöste (Tab. 04).

Da den Calcium-Ionen auch bei der Kreislaufregulation eine wichtige Funktion zukommt, stellte sich die Frage, ob sich die Durchblutung der Organe oder die Sauerstoffversorgung durch die Applikation von Calcium veränderte. Wie aus Tab. 06 hervorgeht, weist die Leber den höchsten Hämoglobingehalt der drei untersuchten Organe auf. In der Lunge ist der Blutgehalt etwas geringer, und die Niere läßt die niedrigsten Werte erkennen. Die Hämoglobin-Konzentrationen dieser Organe veränderten sich durch die Behandlung mit Calcium-Ionen nicht.

Tab. 04: Der Glykogeengehalt der Leber und des Dottersacks nach Applikation von
Calciumchlorid in den Embryo

d	17		18	
	Leber	Dottersack	Leber	Dottersack
	μ Mol Glucose/g Leber			
Kontrolle	79,9 $\pm$ 13,2	42,8 $\pm$ 6,2	101,5 $\pm$ 20,3	60,2 $\pm$ 16,8
n	(10)	(10)	(9)	(9)
CaCl_2	81,0 $\pm$ 11,3	44,7 $\pm$ 7,5	96,0 $\pm$ 18,2	66,5 $\pm$ 14,0
n	(13)	(13)	(10)	(10)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

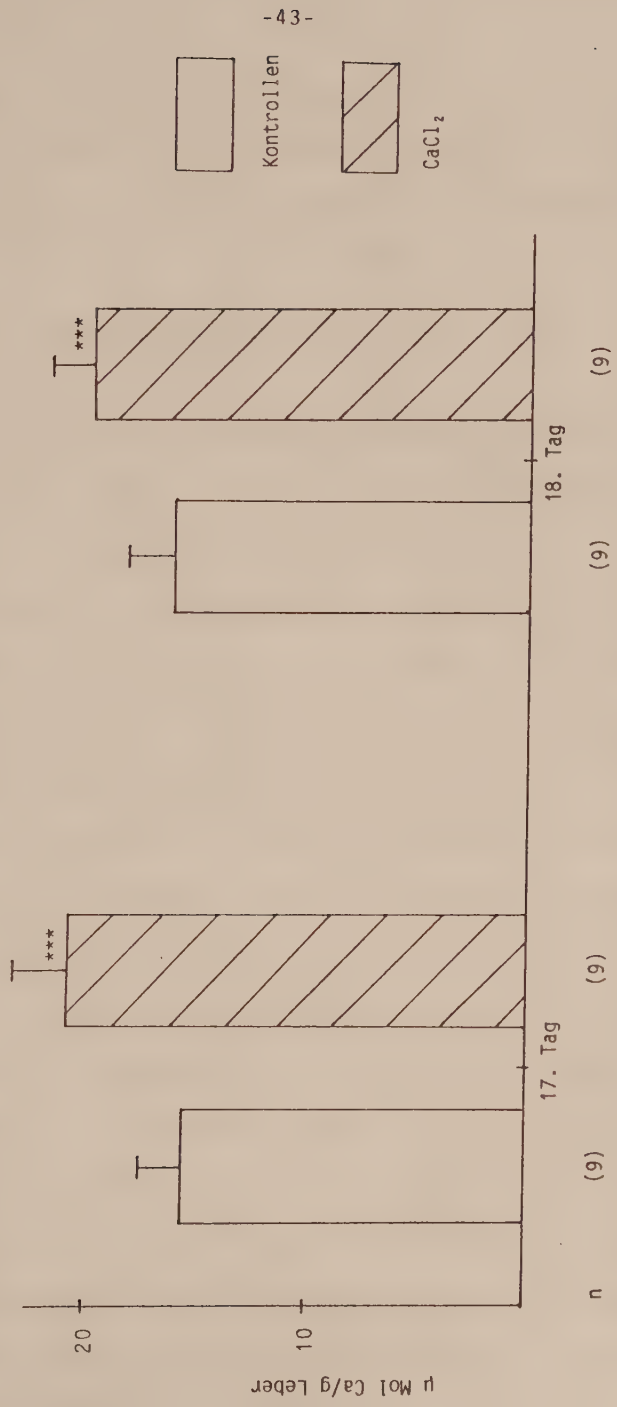
Tab. 05: Der Serumlaktat- und Serumglucosespiegel nach Applikation von Calciumchlorid in den Embryo

d	17		18	
	Laktat	Glucose	Laktat	Glucose
	mg/100 ml			
Kontrolle	7,8 ± 1,9	121,4 ± 9,6	6,9 ± 2,3	118,1 ± 6,5
n	(10)	(10)	(9)	(9)
CaCl ₂	8,5 ± 2,0	126,8 ± 7,0	4,6 ± 1,3	108,4 ± 10,1
n	(13)	(13)	(10)	(10)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

Abb. 02: Der Einfluß exogener Calcium-Ionen auf die Calcium-Konzentration der Leber



n = Probenzahl *** p < 0,001 im Vergleich zu den Kontrollen

Tab. 06. Der Hämoglobingehalt der Lunge, Leber und Niere nach Applikation von Calciumchlorid in den Embryo

d	17		18	
	Kontrollen	CaCl ₂	Kontrollen	CaCl ₂
	$\Delta E / \text{mg Protein}$			
Lunge	$0,029 \pm 0,003$	$0,034 \pm 0,005$	$0,034 \pm 0,003$	$0,038 \pm 0,005$
n	(7)	(9)	(6)	(7)
Niere	$0,013 \pm 0,003$	$0,014 \pm 0,003$	$0,017 \pm 0,002$	$0,015 \pm 0,002$
n	(7)	(9)	(6)	(7)
Leber	$0,041 \pm 0,004$	$0,049 \pm 0,009$	$0,044 \pm 0,007$	$0,042 \pm 0,008$
n	(7)	(9)	(6)	(7)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

Ebenso ließ sich aus den Blutgas-Werten keine Reaktion des Embryos auf die Verabreichung von Calcium-Ionen ersehen. Die Werte von behandelten und unbehandelten Embryonen differieren nicht (Tab. 07).

4.2.2. Calcium-Ionophor (A 23187)

Aufgrund des überraschenden Befundes, daß bei den vorausgegangenen Untersuchungen der Glykogenstoffwechsel nicht beeinflußt worden war, stellte sich nun die Frage, ob sich eine Steigerung der Permeabilität der Zellmembran für Calcium-Ionen auf die Glykogenolyse auswirkt. Um den Eintritt von Calcium in die Zelle zu erleichtern, wurden deshalb 0,03 ml einer 0,93 millimolaren Lösung des Calcium-Ionophors A 23187 verabreicht. Da die Verbindung in Wasser schwer löslich ist, wurde seine Löslichkeit durch eine 10 %ige DMSO-Lösung erhöht. Die Substanz wurde zunächst wieder über die Luftkammer appliziert; allerdings löste dies weder einen Effekt auf die Glykogenolyse (Tab. 08) noch auf den Serumglucose- und Serumlaktatspiegel aus (Tab. 09). Erst als anschließend dieselbe Dosis in den Embryo appliziert wurde, konnte damit in der Leber der Glykogenabbau und im Blut der Laktatanstieg induziert werden (Abb. 03 und 04). Der Serumglucosespiegel blieb dagegen unverändert (Abb. 04). Die parallel dazu durchgeführte Messung von Glykogen in der Dottersackmembran ergab, daß unter diesen Umständen im Dottersack die Glykogenolyse nicht eingeleitet wird (Abb. 03).

Tab. 07: Die Blutgas-Konzentration nach Applikation von Calciumchlorid in den Embryo

d	17		18	
	Kontrollen	CaCl ₂	Kontrollen	CaCl ₂
pH	7,386 ± 0,043 (7)	7,391 ± 0,040 (8)	7,447 ± 0,038 (7)	7,428 ± 0,033 (7)
pCO ₂ (mm Hg)	32,2 ± 2,4 (7)	31,6 ± 2,3 (8)	31,7 ± 3,3 (7)	33,8 ± 3,9 (7)
pO ₂ (mm Hg)	50,1 ± 2,5 (7)	51,3 ± 3,9 (8)	49,7 ± 6,8 (7)	49,7 ± 6,0 (7)
HCO ₃ ⁻ (mVal/l)	20,2 ± 1,6 (7)	20,4 ± 1,1 (8)	22,0 ± 1,2 (7)	22,4 ± 2,2 (7)
BE (mVal/l)	1,8 ± 0,5 (7)	1,3 ± 0,6 (8)	2,0 ± 0,8 (7)	1,7 ± 0,8 (7)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

BE = Basenexzeß

Tab. 08: Der Glykogengehalt der Leber nach Applikation von A 23187 in die Luftkammer

d	17	18
	μ Mol Glucose/g Leber	
Kontrolle	$80,4 \pm 11,6$	$115,3 \pm 15,6$
n	(8)	(8)
A 23187	$84,2 \pm 10,2$	$102,7 \pm 10,3$
n	(7)	(8)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

Tab. 09: Der Serumlaktat- und Serumglucosespiegel nach Applikation von A 23187 in die Luftkammer

d	17		18	
	Laktat	Glucose	Laktat	Glucose
	mg/100 ml			
Kontrolle	$6,9 \pm 2,4$	$126,3 \pm 10,1$	$5,2 \pm 0,9$	$122,0 \pm 10,6$
n	(8)	(8)	(8)	(7)
A 23187	$8,0 \pm 2,2$	$113,4 \pm 6,5$	$7,2 \pm 2,4$	$111,7 \pm 2,1$
n	(7)	(7)	(8)	(7)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

Abb. 03: Der Einfluß von A 23187 auf den Glykogeengehalt der Leber (L) und des Dottersacks (DS)

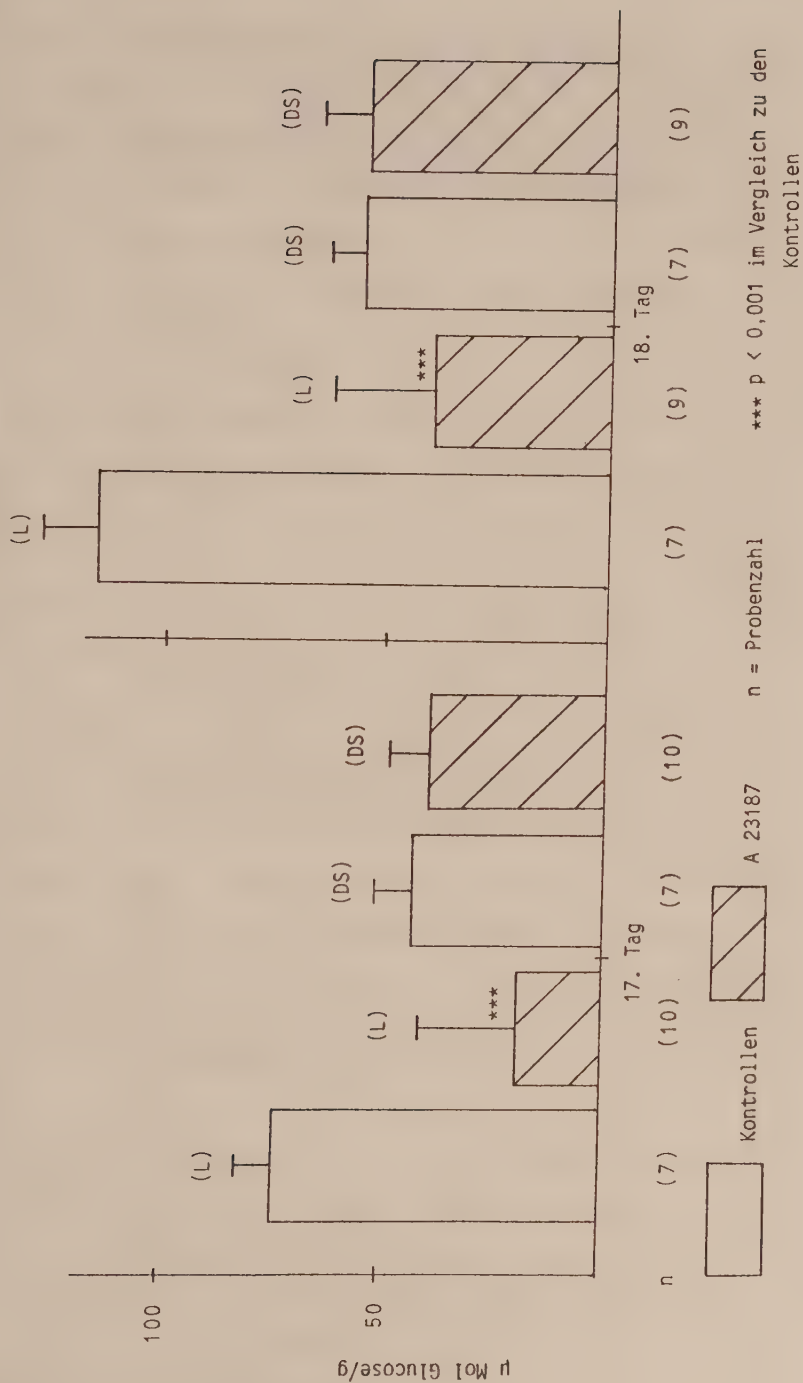
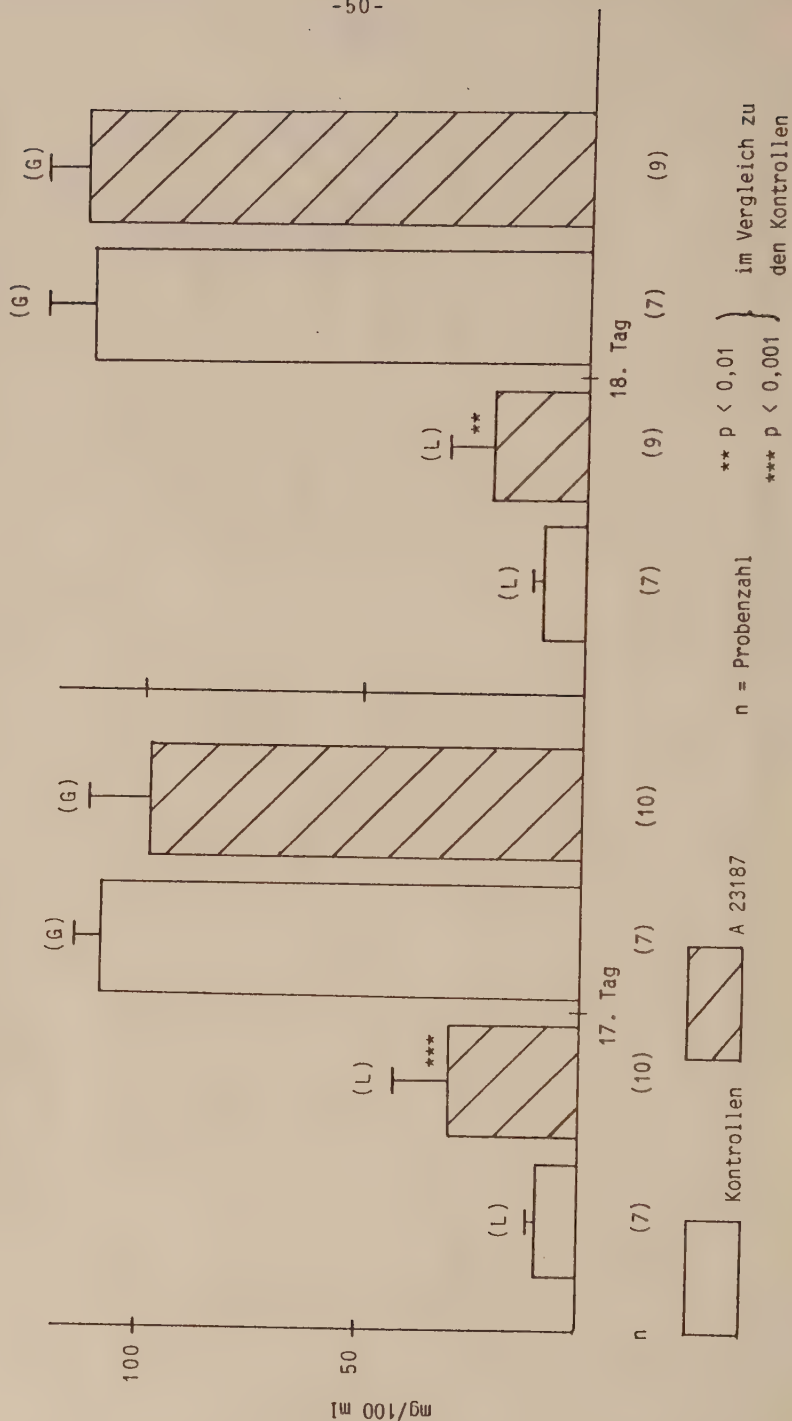


Abb. 04: Der Serumlaktat- (L) und Serumglucosespiegel (G) nach Applikation von A 23187 in den Embryo



Anschließend wurde die Calcium-Konzentration in der Leber bestimmt. Die mit A 23187 behandelten Embryonen wiesen allerdings keinen erhöhten Calciumgehalt auf (Tab. 10). Auch die Hämoglobin- und Blutgas-Konzentrationen blieben unverändert (Tab. 11 und 12).

4.2.3. Nifedipin

Nachdem eine Wirkung von Calcium-Ionen auf den Glykogenstoffwechsel nachgewiesen werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob eine Substanz, die den Calcium-einstrom hemmt, sich auf den Glykogenstoffwechsel auswirkt. Hierzu wurde der Calcium-Kanal-Blocker Nifedipin eingesetzt. Von dieser Substanz wurden 0,01 ml einer 14,5 millimolaren Lösung in die Luftkammer appliziert. Da Nifedipin, wie A 23187, nicht wasserlöslich ist, mußte auch hier auf DMSO als Lösungsmittel zurückgegriffen werden. Es zeigte sich in der Leber eine erhöhte Glykogenolyserate, während sich im Dottersack kein Effekt einstellte (Abb. 05). Der Serum-laktatspiegel stieg dabei an (Abb. 06); demgegenüber blieb der Glucosespiegel bis auf eine leichte Zunahme am 18. Tag unbeeinflusst (Abb. 06).

Unter dem Einfluß von Nifedipin änderte sich der Hämoglobingehalt von Niere, Lunge und Leber nicht (Tab. 13). Auch die Blutgas-Werte (Tab. 14) und der Calciumgehalt der Leber blieben konstant (Tab. 15).

Tab. 10: Der Calciumgehalt der Leber nach Applikation von A 23187 in den Embryo

d	μ Mol Calcium/g Leber	
	17	18
Kontrolle	$16,1 \pm 1,7$	$16,1 \pm 2,5$
n	(8)	(8)
A 23187	$16,7 \pm 2,1$	$16,6 \pm 1,8$
n	(8)	(8)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

Tab. 11: Der Hämoglobingehalt der Lunge, Niere und Leber nach Applikation von A 23187 in den Embryo

d	17		18	
	Kontrollen	A 23187	Kontrollen	A 23187
	$\Delta E / \text{mg Protein}$			
Lunge	$0,029 \pm 0,002$	$0,030 \pm 0,002$	$0,034 \pm 0,002$	$0,035 \pm 0,003$
n	(7)	(8)	(7)	(8)
Niere	$0,013 \pm 0,001$	$0,013 \pm 0,002$	$0,016 \pm 0,004$	$0,018 \pm 0,003$
n	(7)	(8)	(7)	(8)
Leber	$0,045 \pm 0,006$	$0,042 \pm 0,006$	$0,041 \pm 0,007$	$0,041 \pm 0,007$
n	(7)	(8)	(7)	(8)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

Tab. 12: Die Blutgas-Konzentration nach Applikation von A 23187 in den Embryo

d	17		18	
	Kontrollen	A 23187	Kontrollen	A 23187
pH	7,421 ± 0,039 (8)	7,423 ± 0,056 (11)	7,432 ± 0,039 (7)	7,414 ± 0,027 (8)
pCO ₂ (mm Hg)	30,4 ± 3,0 (8)	30,5 ± 4,9 (11)	32,2 ± 3,4 (7)	34,1 ± 2,9 (8)
pO ₂ (mm Hg)	49,9 ± 4,3 (8)	50,9 ± 4,5 (11)	49,3 ± 2,3 (7)	48,9 ± 2,9 (8)
HCO ₃ ⁻ (mVal/l)	21,0 ± 2,9 (8)	20,7 ± 2,4 (11)	22,9 ± 1,9 (7)	21,0 ± 2,1 (8)
BE (mVal/l)	2,0 ± 0,8 (8)	1,7 ± 0,4 (11)	1,5 ± 0,7 (7)	1,8 ± 0,4 (8)
d = Inkubationstage	n = Probenzahl		8E = Basenexzeß	

Abb. 05: Der Einfluß von Nifedipin auf den Glykogengehalt der Leber (L) und des Dottersacks (DS)

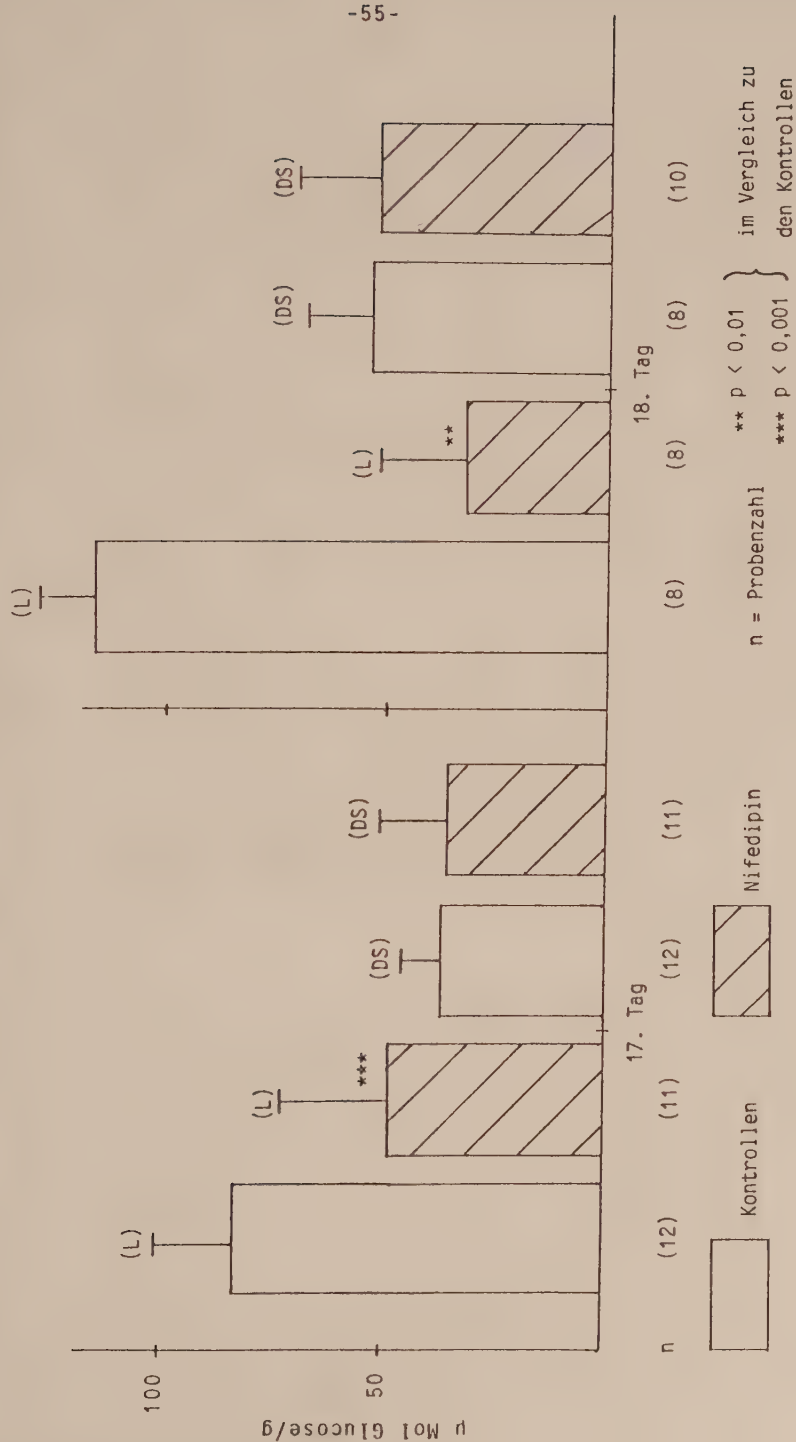
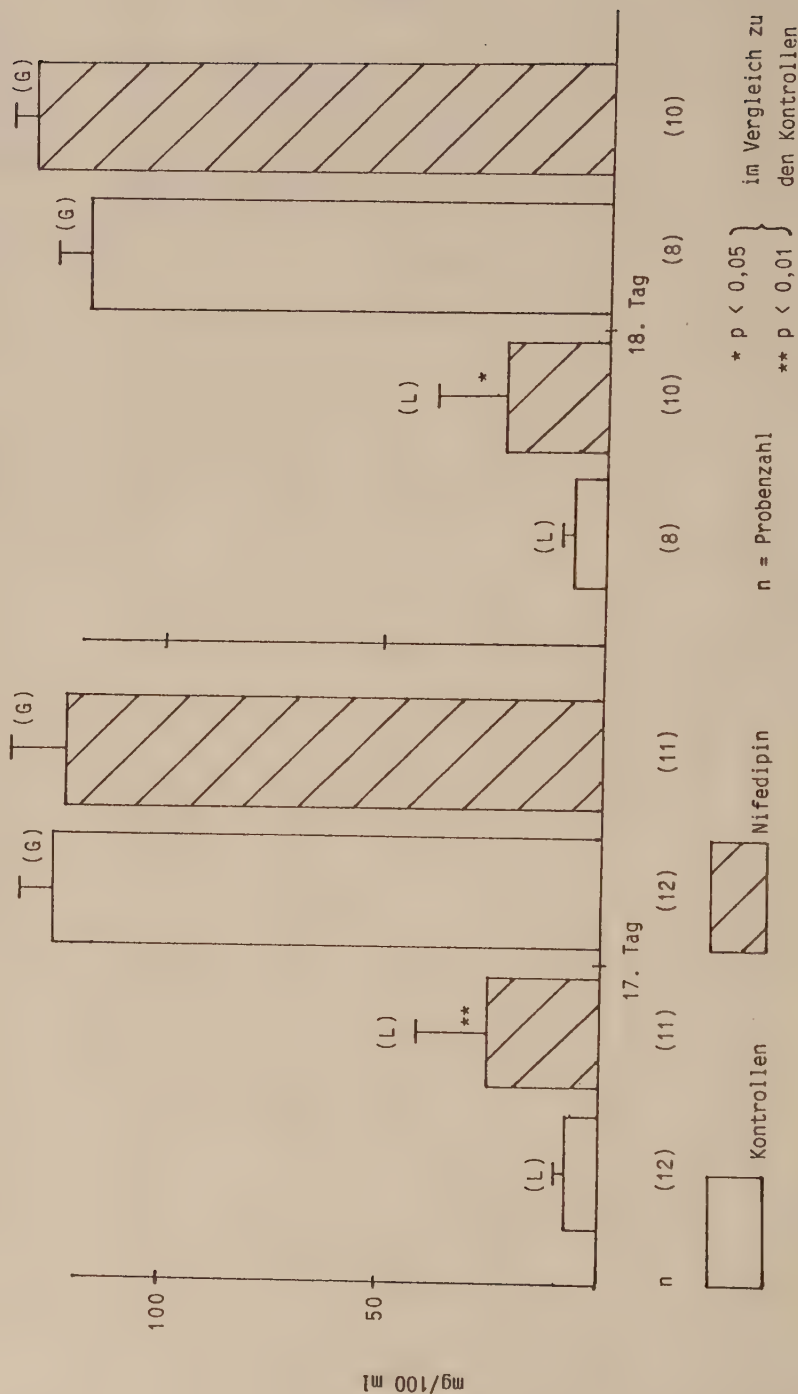


Abb. 06: Der Einfluß von Nifedipin auf den Serumlaktat- (L) und Serumglucosespiegel (G)



Tab. 13: Der Hämoglobingehalt von Lunge, Niere und Leber unter dem Einfluß von Nifedipin

d	17		18	
	Kontrollen	Nifedipin	Kontrollen	Nifedipin
	$\Delta E/mg \text{ Protein}$			
Lunge	$0,031 \pm 0,002$	$0,030 \pm 0,003$	$0,036 \pm 0,003$	$0,037 \pm 0,004$
n	(7)	(8)	(7)	(8)
Niere	$0,012 \pm 0,002$	$0,016 \pm 0,002$	$0,017 \pm 0,002$	$0,018 \pm 0,003$
n	(7)	(8)	(7)	(8)
Leber	$0,051 \pm 0,003$	$0,048 \pm 0,007$	$0,049 \pm 0,005$	$0,051 \pm 0,007$
n	(7)	(8)	(7)	(8)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

Tab. 14: Die Blutgas-Konzentration unter dem Einfluß von Nifedipin

d	17		18	
	Kontrollen	Nifedipin	Kontrollen	Nifedipin
pH	7,418 ± 0,040	7,412 ± 0,043	7,439 ± 0,036	7,402 ± 0,026
n	(7)	(8)	(7)	(8)
pCO ₂ (mm Hg)	33,9 ± 2,7	35,5 ± 3,1	34,4 ± 3,1	34,6 ± 2,3
n	(7)	(8)	(7)	(8)
pO ₂ (mm Hg)	49,6 ± 2,6	50,8 ± 2,8	48,3 ± 2,5	49,2 ± 2,7
n	(7)	(8)	(7)	(8)
HCO ₃ ⁻ (mVal/l)	22,1 ± 2,4	19,9 ± 2,3	23,6 ± 1,5	20,9 ± 2,2
n	(7)	(8)	(7)	(8)
BE (mVal/l)	0,9 ± 0,4	1,8 ± 0,4	1,3 ± 0,7	1,6 ± 0,6
n	(7)	(8)	(7)	(8)

d = Inkubationstage n = Probenzahl BE = Basenexzeß

Tab. 15: Der Calcium- und ATP-Gehalt der Leber unter dem Einfluß von Nifedipin

d	17		18	
	Calzium	ATP	Calzium	ATP
	μ Mol/g Leber			
Kontrollen	17,5 $\pm$ 2,1	3,2 $\pm$ 1,1	16,0 $\pm$ 2,7	2,6 $\pm$ 0,8
n	(7)	(8)	(7)	(7)
Nifedipin	17,4 $\pm$ 3,0	3,4 $\pm$ 0,6	15,7 $\pm$ 2,4	2,8 $\pm$ 0,4
n	(9)	(9)	(9)	(7)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß Nifedipin den Energiestoffwechsel der Leber beeinflußt und auf diese Weise auf den Glykogenstoffwechsel einwirkt, wurde anschließend der ATP-Gehalt nach Verabreichung von Nifedipin untersucht. Es zeigte sich, daß die behandelten Embryonen einen ebenso hohen ATP-Gehalt aufwiesen wie die Kontrollen (Tab. 15).

4.2.4. Adenosin

Das Purinnucleotid Adenosin beeinflußt, neben seiner Wirkung auf den Kreislauf, auch den Glykogenstoffwechsel. Im folgenden interessierte, ob derartige Effekte auch beim Hühnerembryo auftreten. Es wurden daher 0,15 ml einer 187 millimolaren Suspension in den Embryo appliziert. Diese Suspension wurde mit 0,9 %iger NaCl-Lösung hergestellt. Es ergab sich ein deutlicher Glykogenabfall am 17. Tag (Abb. 07). Darüber hinaus war auch im Dottersack ein geringer Glykogenabfall festzustellen, der allerdings statistisch nicht abzusichern war (Abb. 07). Gleichzeitig erhöhte sich geringgradig der Serumlaktatspiegel, während die Blutglucose unverändert blieb (Abb. 08).

Am 18. Tag konnte weder in der Leber noch im Dottersack eine Glykogenolyse festgestellt werden (Abb. 07). Demzufolge blieb auch der Serumlaktatwert konstant (Abb. 08).

Abb. 07: Der Einfluß von Adenosin auf den Glykogengehalt der Leber (L) und des Dottersacks (DS)

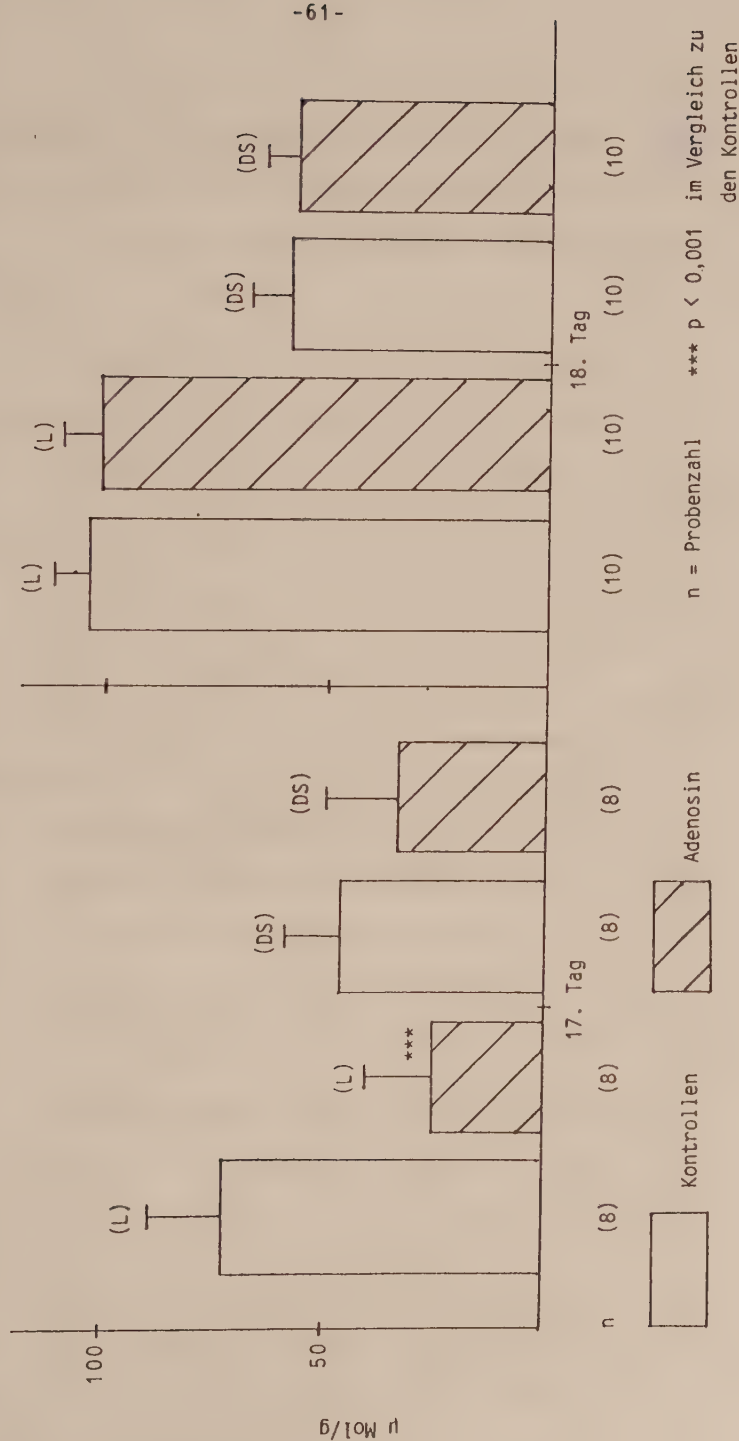
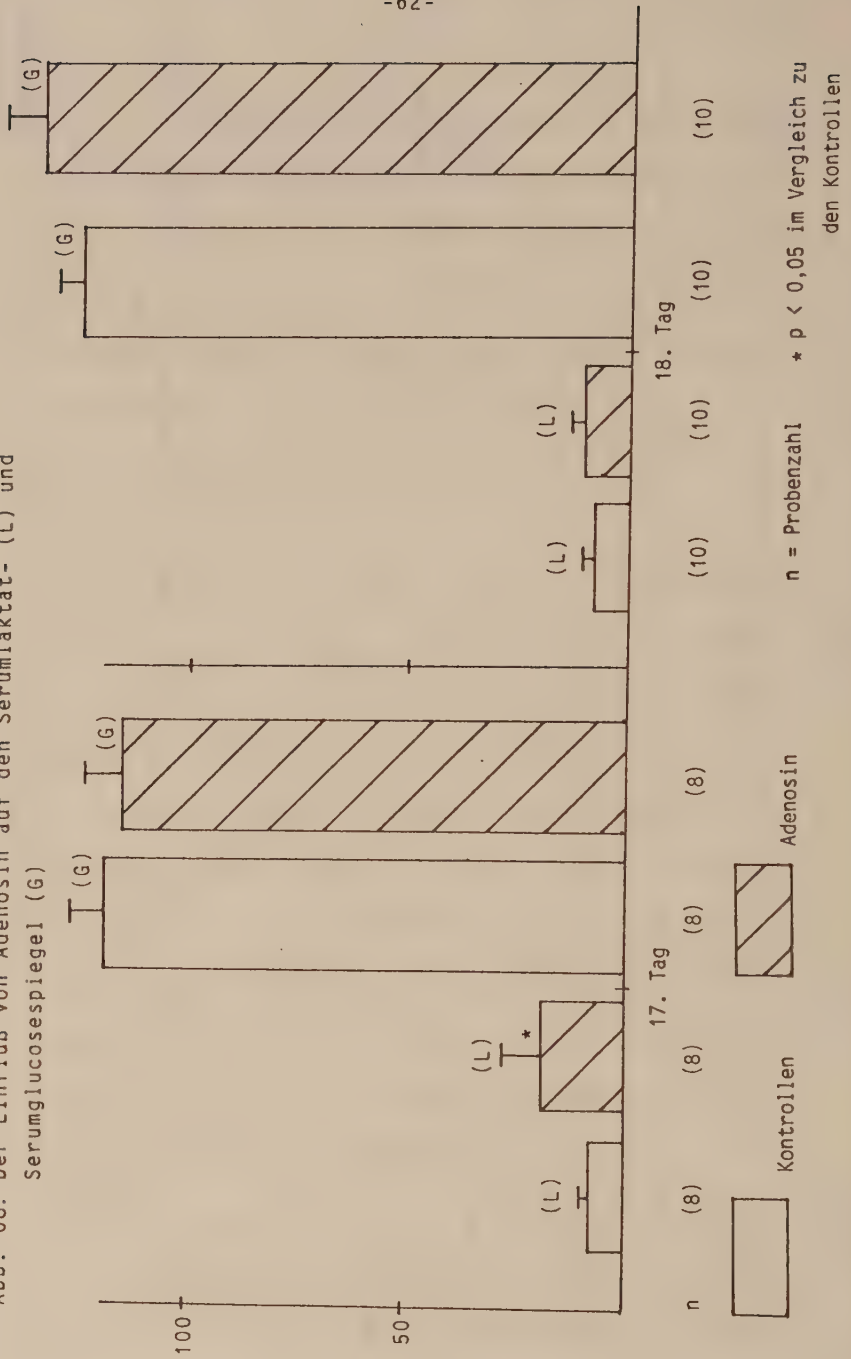


Abb. 08: Der Einfluß von Adenosin auf den Serumlaktat- (L) und Serumglucosespiegel (G)



Veränderungen der Hämoglobingehalte von Niere, Lunge und Leber konnten nicht festgestellt werden (Tab. 16). Auch die Blutgas-Konzentrationen (Tab. 17) blieben unbeeinflusst.

Da die Auslösung der Glykogenolyse durch Adenosin offensichtlich entwicklungsabhängig ist, sollte in einem orientierenden Versuch geklärt werden, ob Adenosin auch zu einem noch früheren Zeitpunkt wirksam ist. Es wurden daher Embryonen vom 14. Inkubations-tag in die Untersuchungen mit einbezogen. In diesem frühen Entwicklungsstadium bot sich die Möglichkeit der direkten Applikation in das Blut. Dabei wurden 0,05-0,07 ml einer 0,5 millimolaren Lösung auf dieselbe Weise wie das Noradrenalin injiziert. Wie Tab. 18 zeigt, weisen die mit Adenosin behandelten Embryonen einen wesentlich verminderten Glykogengehalt in der Leber, allerdings nicht im Dottersack auf.

4.2.4.1. Die Wirkung von Adenosin auf den Blutdruck

Die bisherigen Untersuchungen (Hämoglobin-Nachweis, Blutgas-Bestimmung) hatten keine Hinweise dafür ergeben, daß mit den eingesetzten Substanzen nachhaltige Eingriffe auf den Blutkreislauf ausgeübt werden können. In einem abschließenden Versuch sollte daher ergänzend der Blutdruck bestimmt werden. Dazu wurde Adenosin (0,5 millimolar) am 17. Tag eingesetzt. Nach

Tab. 16: Der Hämoglobingehalt von Lunge, Niere und Leber unter dem Einfluß von Adenosin

d	17		18	
	Kontrollen	Adenosin	Kontrollen	Adenosin
	$\Delta E / \text{mg Protein}$			
Lunge				
n	$0,031 \pm 0,004$ (7)	$0,030 \pm 0,003$ (8)	$0,041 \pm 0,004$ (7)	$0,036 \pm 0,003$ (8)
Niere				
n	$0,012 \pm 0,001$ (7)	$0,012 \pm 0,001$ (8)	$0,018 \pm 0,002$ (7)	$0,017 \pm 0,002$ (8)
Leber				
n	$0,047 \pm 0,007$ (7)	$0,049 \pm 0,005$ (8)	$0,044 \pm 0,005$ (7)	$0,048 \pm 0,006$ (8)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

Tab. 17: Die Blutgas-Konzentration unter dem Einfluß von Adenosin

d	17		18	
	Kontrollen	Adenosin	Kontrollen	Adenosin
pH	7,426 ± 0,031	7,393 ± 0,060	7,432 ± 0,032	7,434 ± 0,036
n	(7)	(7)	(8)	(8)
pCO ₂ (mm Hg)	36,2 ± 2,9	37,6 ± 3,0	36,3 ± 2,1	34,3 ± 4,2
n	(7)	(7)	(8)	(8)
pO ₂ (mm Hg)	47,9 ± 1,6	49,3 ± 2,5	49,4 ± 2,8	49,5 ± 2,4
n	(7)	(7)	(8)	(8)
HCO ₃ ⁻ (mVal/l)	24,0 ± 1,0	23,4 ± 3,9	21,9 ± 2,4	22,1 ± 2,4
n	(7)	(7)	(8)	(8)
BE (mVal/l)	2,2 ± 0,8	1,6 ± 0,6	1,8 ± 0,6	1,4 ± 0,3
n	(7)	(7)	(8)	(8)

d = Inkubationstage

n = Probenzahl

BE = Basenexzeß

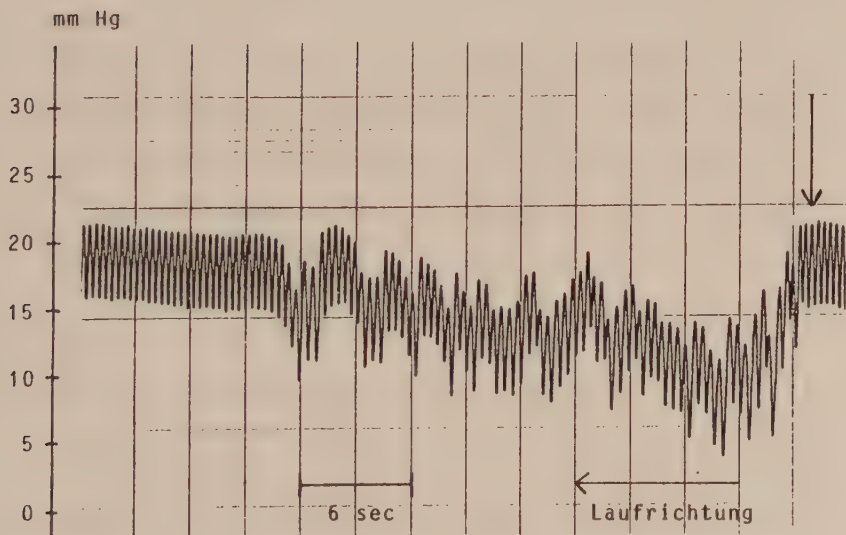
Tab. 18: Der Glykogengehalt von Leber und Dottersack nach Applikation von Adenosin in die Arteria umbilicalis (nur Einzelwerte angegeben)

d	14		17	
	Leber	Dottersack	Leber	Dottersack
	μ Mol Glucose/g			
Kontrolle	9,2	13,3	70,7	25,6
Adenosin	3,1	13,7	44,8	30,2
	3,7	16,5	42,3	25,6

d = Inkubationstage

Applikation von 0,05-0,07 ml konnte ein Blutdruckabfall gemessen werden (Abb. 09). Hingegen scheiterte der Versuch am 18. Tag, da, wie in Abschnitt 3.3. beschrieben, die Zirkulation nach der Punktion immer wieder unterbrochen wurde.

Abb. 09: Der Einfluß von Adenosin auf den Blutdruck
am 17. Tag.



↓
= Adenosinapplikation

5. DISKUSSION

Die bereits pränatal einsetzende Glykogenolyse beim Vogel ist ein seit langem bekanntes Phänomen. Es ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt, welcher Mechanismus letztlich diesen Prozeß in Gang setzt.

Wie mehrfach ausgeführt, befindet sich der Vogelembryo zum Zeitpunkt der einsetzenden Glykogenolyse in einem hypoxischen Zustand. Bedenkt man, daß jeder Organismus auf Sauerstoffmangel mit einem beschleunigten Abbau von Glykogen reagiert, so liegt die Vermutung nahe, daß auch beim Vogelembryo ein Zusammenhang zwischen Hypoxie und Glykogenolyse besteht. Außerdem enthält die Arbeit von Prechtel (43) Hinweise für eine Wechselbeziehung zwischen Hypoxie und dem steilen Anstieg des Serumkatecholaminspiegels beim Einsetzen der Glykogenolyse.

Es muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die sich langsam aber stetig entwickelnde Hypoxie einen immer größeren Stressor für den Vogelembryo darstellt. Er reagiert schließlich mit der Ausschüttung der Katecholamine. Dies hat zur Folge, daß über eine verstärkte Durchblutung der Chorioallantoismembran die Sauerstoffversorgung, zumindest vorübergehend, verbessert wird. Zum anderen wird über die Einleitung der Glykogenolyse vermehrt Glucose zur Verfügung gestellt.

Hinsichtlich der Auslösung der Glykogenolyse durch Katecholamine kommen als intrazelluläre Effektoren zwei Substanzen in Frage, nämlich cyclo AMP und Calcium-Ionen. Geht man davon aus, daß cyclo AMP den entscheidenden "second messenger" für die einsetzende Glykogenolyse am 19. Inkubationstag darstellt, so sollte zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte cyclo AMP-Konzentration in der Leberzelle vorliegen. Dies konnte jedoch von Weiß (63) nicht aufgezeigt werden. Daraus kann man schließen, daß cyclo AMP nicht als entscheidender Stimulus für die Glykogenolyse in Frage kommt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluß von Calcium-Ionen auf den Glykogenstoffwechsel der embryonalen Leber untersucht. Trotz der Anreicherung von Calcium-Ionen in der Leber (Abb. 02) konnte kein Effekt auf die Glykogenolyse erzielt werden (Tab. 04). Dieses Ergebnis führte zu dem Schluß, daß ein zusätzlicher Faktor notwendig ist, mit dessen Hilfe Calcium intrazellulär für die Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase verfügbar gemacht werden muß. In der Annahme, daß die Zellmembran selbst den limitierenden Faktor für den Calziumeinstrom darstellt, wurde mit A 23187 eine Substanz gewählt, die die Membranpermeabilität für Calcium in der Leber erhöht. Tatsächlich konnte auf diese Weise die Glykogenolyse induziert werden (Abb. 03). Dies erfolgte ohne gleichzeitige Erhöhung des Calciumgehaltes in der Leber (Tab. 10). Dieser Befund deutet darauf hin, daß eine

zusätzliche Akkumulation von Calcium in der Leber für die Auslösung der Glykogenolyse nicht notwendig ist. Entscheidend ist vielmehr, daß über die Beeinflussung der Zellmembran die Umverteilung der Calcium-Ionen vom Extra- in den Intrazellulärraum ermöglicht wird.

Legt man diesen Mechanismus zugrunde, so überrascht, daß nach der Applikation von Nifedipin ebenfalls ein Abbau von Glykogen in der Leber zu beobachten war (Abb. 05). Da diese Substanz sich hemmend auf den Calciumeinstrom auswirkt, wäre eher mit einem gegenteiligen Effekt zu rechnen gewesen. Es sei jedoch vermerkt, daß Nifedipin insbesondere die potentialabhängigen Calciumkanäle blockiert (23, 57), die vor allem in der Membran erregbarer Zellen vorkommen. Bei der Leberzelle hingegen muß man sich die Regulation des Calcium-Transportes eher über rezeptorabhängige Kanäle vorstellen.

Wie anfangs erwähnt, reagiert jeder Organismus auf Hypoxie mit dem Abbau von Glykogen. Aus den ermittelten Blutgas-Werten (Tab. 14) ergibt sich jedoch kein Hinweis darauf, daß bei den mit Nifedipin behandelten Embryonen Sauerstoffmangel aufgetreten ist. Weiterhin deuten die Hämoglobin-Werte (Tab. 13) nicht auf eine Beeinflussung der Blutzirkulation durch Nifedipin hin. Schließlich kann auch aus den ATP-Werten nicht gefolgert werden, daß Nifedipin den sauerstoffab-

hängigen Energiestoffwechsel nachhaltig beeinflußt hat (Tab. 15). Somit liefern die Untersuchungen keinen Hinweis dafür, inwieweit durch Nifedipin die Glykogenolyse ausgelöst wird. Es ist jedoch zu bedenken, daß unter dem Einfluß von Nifedipin vermehrt Katecholamine, insbesondere Noradrenalin, ausgeschüttet werden (07, 12, 36). Man muß daher mit der Möglichkeit rechnen, daß die glykogenolytische Wirkung von Nifedipin indirekt über Katecholamine zustande kommt. Geht man schließlich davon aus, daß die Wirkung in erster Linie durch Noradrenalin entsteht, dann würden auch hier Calcium-Ionen als "second messenger" in Frage kommen.

Auch Adenosin zeigte eine glykogenolytische Wirkung (Abb. 07). Ähnlich wie beim Nifedipin war weder eine Änderung der Blutgas-Konzentration (Tab. 17) noch des Hämoglobingehaltes bei den untersuchten Organen (Tab. 16) festzustellen. Allerdings konnte mit Adenosin der Blutdruck gesenkt werden (Abb. 09). Insgesamt sprechen diese Ergebnisse nicht dafür, daß die glykogenolytische Wirkung von Adenosin über eine Hypoxie ausgelöst wurde.

Ein deutlicher Unterschied zu Nifedipin ist darin gegeben, daß Adenosin seine Wirkung auf den Glykogenabbau in der Leber nur bis zum 17. Tag entfalten konnte. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Wirkung von

Adenosin auf andere Weise zustande kommt als die von Nifedipin. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die glykogenolytische Wirkung von Adenosin in Ratten-Hepatozyten mit dem intrazellulären Effektor cyclo AMP einhergeht (30). Dieser "second messenger" kommt zwar, wie bereits aufgezeigt, als natürlicher Auslöser der Glykogenolyse beim Hühnerembryo nicht in Frage. Es liegen aber Befunde darüber vor (63), daß eine Erhöhung der cyclo AMP-Konzentration in der Leber durch exogene Eingriffe auch beim Hühnerembryo zum Abbau des Glykogens führt. Da eine Wirkung von Adenosin über Calcium-Ionen nicht bekannt ist, liegt die Vermutung nahe, daß cyclo AMP den intrazellulären Effektor von Adenosin darstellt.

Der Befund, daß Adenosin die Glykogenolyse beim Hühnerembryo auslöst, ist insofern interessant, als Adenosin ein Abbauprodukt von ATP ist. In früheren Versuchen war aufgefallen, daß sich gegen Ende der Inkubation der ATP-Gehalt in der Kükenleber verringert, ohne daß damit ein gleichzeitiger Anstieg von ADP oder AMP verbunden ist (61). Daraus muß man ableiten, daß das aus ATP gebildete AMP weiter zu Adenosin abgebaut wird. Theoretisch käme also für die Auslösung der Glykogenolyse am 19. Tag auch Adenosin in Frage. Dem steht allerdings entgegen, daß Adenosin nach dem 17. Tag keine Wirkung mehr auf das Leber-Glykogen erzielte. Außerdem müßte man dann, wie oben ausgeführt, einen

Anstieg von cyclo AMP erwarten, der jedoch unter in vivo-Bedingungen nicht beobachtet worden ist. Möglicherweise steht das Ausbleiben der Adenosin-Wirkung nach dem 17. Tag mit der Aktivität der Adenosin-Desaminase in Beziehung, einem Enzym, das Adenosin weiter abbaut. Nach Romanoff (47) nimmt die Aktivität dieses Enzyms zu der Zeit deutlich zu. Es ist daher mit der Möglichkeit zu rechnen, daß durch die erhöhte Enzymaktivität das Adenosin weiter abgebaut wird, noch bevor es seine Wirkung entfalten kann.

Vergleicht man die Glykogenolyse in Leber und Dottersack, so fällt auf, daß in der Leber der Abbau des Glykogens bereits am 19. Tag eingesetzt hat, im Dottersack jedoch erst am 20. Tag (Abb. 01). Außerdem ergaben die Untersuchungen, daß die eingesetzten Substanzen (A 23187, Nifedipin, Adenosin) die Glykogenolyse in der Leber, aber nicht im Dottersack auslösten (Abb. 03, 05, 07). Damit stellt sich die Frage, ob im Dottersack die Glykogenolyse über einen ganz anderen Mechanismus ausgelöst wird, oder ob die eingesetzten Substanzen den Dottersack nicht erreichten. Es sei jedoch vermerkt, daß Thomas und Just (56) die Glykogenolyse im Dottersack über Glucagon auslösen konnten. Auffallend ist, daß die Glykogenolyse im Dottersack in der Phase eingeleitet wird, in der auch die Lungenatmung einsetzt. Da dies mit einer Abnahme der peripheren Zirkulation einhergeht, spielt möglicherwei-

se die Verminderung der Blutversorgung des Dottersacks eine Rolle für die Auslösung der Glykogenolyse.

Aus dieser Arbeit geht hervor, daß die ausgelöste Glykogenolyse mit einem Anstieg von Laktat, aber nicht von Glucose im Blut verbunden ist (Abb. 04, 06, 08). Offensichtlich wird die aus Glykogen freigesetzte Glucose rasch zu Laktat abgebaut. Demnach ist der Vo-gelembryo in der Lage, den Blutglucosespiegel konstant zu halten. Andererseits ist er fähig, hohe Laktat-Konzentrationen im Blut zu tolerieren. Weiterhin fällt auf, daß der Anstieg von Laktat im Blut nicht zu einer deutlichen Veränderung des Blut-pH-Wertes führte (Tab. 12, 14, 17). Demzufolge verfügt der Hühnerembryo auch über eine entsprechend hohe Pufferkapazität.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Neuere Versuche deuten darauf hin, daß die Glykogenolyse in der spätembryonalen Phase des Hühnerkükens über Katecholamine reguliert wird. Als "second messengers" kommen theoretisch Calcium-Ionen und cyclo AMP in Frage. Da bisher keine Veränderungen des cyclo AMP-Spiegels zum Zeitpunkt der einsetzenden Glykogenolyse beim Hühnerembryo beobachtet werden konnten, erscheint eine Beteiligung von cyclo AMP an der Auslösung der Glykogenolyse nicht sehr wahrscheinlich. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich daher in erster Linie mit der Funktion der Calcium-Ionen beim Glykogenabbau.

Orientierende Versuche zeigten, daß Noradrenalin, dessen Wirkung hauptsächlich über Calcium-Ionen zustande kommt, einen vorzeitigen Glykogenabbau in der Leber, aber nicht im Dottersack, auslöst. Daran anschließende Versuche, die Glykogenolyse über Calcium-Ionen, die in die Luftkammer bzw. direkt in den Embryo appliziert wurden, auszulösen, waren nicht erfolgreich. Hingegen bewirkte ein Calcium-Ionophor (A 23187) einen vorzeitigen Glykogenabbau in der Leber. Diese Befunde deuten darauf hin, daß der Einstrom von Calcium-Ionen in die Leberzelle den limitierenden Faktor darstellt.

Überraschenderweise führte die Applikation von Nifedipin, einem Calcium-Kanal-Blocker, ebenfalls zur Auslösung der Glykogenolyse. Es ist die Vermutung nahelegend, daß der Calciumeinstrom in die Leberzelle über die α -Rezeptoren und nicht über potentialabhängige Calciumkanäle reguliert wird. Da von Nifedipin bekannt ist, daß es über Noradrenalin die α -Rezeptoren stimuliert, kommt die beobachtete Glykogenolyse möglicherweise über diesen Mechanismus zustande.

Auch Adenosin ist als ein potentieller Induktor für die Glykogenolyse anzusehen. In der vorliegenden Arbeit konnte das Leber-Glykogen durch die Applikation von Adenosin vorzeitig abgebaut werden. Dabei zeigte sich, daß diese Substanz in der Leber nur bis zum 17. Tag wirksam ist. Da unter in vivo-Bedingungen die Glykogenolyse erst nach diesem Zeitpunkt einsetzt, ist deren Auslösung über diese Substanz nicht sehr wahrscheinlich.

Im Gegensatz zur Leber konnte im Dottersack die Glykogenolyse durch die verabreichten Substanzen nicht ausgelöst werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß unter natürlichen Bedingungen der Abbau des Glykogens im Dottersack nicht parallel mit dem der Leber verläuft. Möglicherweise steht die Auslösung der Glykogenolyse im Dottersack mit der Umstellung des Blutkreislaufs, der sich um die Zeit der einsetzenden Lun-

genatmung vollzieht, in Zusammenhang.

Die Untersuchungen ergaben keinen Hinweis dafür, daß die Auswirkungen der verabreichten Substanzen auf die Glykogenolyse über Veränderungen der Blutgase bzw. der Blutzirkulation zustande kommen.

7. SUMMARY

Effects of calcium-ions on the regulation of glycogen metabolism and circulation of the chick (*Gallus domesticus*) in the late embryonic phase.

Recent experiments indicate that glycogenolysis is regulated by catecholamines in the late embryonic phase of the chick. Theoretically, calcium-ions and cyclic AMP may act as "second messengers". Because up to now no changes of cyclic AMP-concentrations could be observed at the time of beginning glycogenolysis of the chick embryo, it is not very likely that cyclic AMP is involved in stimulation of glycogenolysis. This thesis is dealing with the function of calcium-ions in glycogen metabolism.

Preliminary experiments showed that noradrenaline, which acts via calcium-ions, induces a precocious glycogenolysis in the liver but not in the yolk sac. In the following experiments calcium-ions were delivered into the air space, and directly into the embryo, respectively, in order to stimulate glycogenolysis. But this was not successful. On the other hand precocious glycogenolysis could be induced in the liver by a calcium-ionophor (A 23187). These findings indicate that the calcium-influx into the liver cell represents the limiting factor.

Surprisingly, Nifedipine, a calcium-channel-blocking agent, also induced glycogenolysis. Probably, calcium-influx into the liver cell is regulated by α -receptors and not by voltage-dependant calcium-channels. Nifedipine is known to stimulate α -receptors by increasing plasma noradrenaline. The glycogenolysis as released by Nifedipine may be induced by this mechanism.

Adenosine also is a potential inductor of glycogenolysis. In this thesis liver-glycogen could be metabolized precociously by delivering adenosine. But this substance was only effective up to day 17. Because under in vivo-conditions glycogenolysis is initiated after this time, it is not very likely that glycogen degradation is stimulated by this substance.

Contrary to the liver glycogenolysis could not be induced in the yolk sac by the substances mentioned above. In this connexion it is interesting to note that under natural conditions the glycogenolysis in the yolk sac does not develop parallel to the liver. Perhaps there is an interrelationship between the glycogenolysis in the yolk sac and the changes of circulation, which occur at the beginning of the lung aspiration.

In the experiments there were no indications that the effects of the delivered substances on glycogenolysis are correlated with changes of the blood gases or the circulation.

8. LITERATURVERZEICHNIS

01. Alquist R.P. (1948)
A study on the adrenotropic receptors.
American Journal of Physiology 153, 586-600.
02. Bergmeyer H.U., Bernt E., Schmidt F.,
Stork H. (1970)
In: Methoden der enzymatischen Analyse,
Bergmeyer H.U. (ed.),
Verlag Chemie Weinheim, 1163-1168.
03. Berne R.M., Rubio R., Curnish R.R. (1974)
Release of adenosine from ischaemic brain.
Effect on cerebral vascular resistance and incorporation into cerebral adenine nucleotides.
Circulation Research 35, 262-271.
04. Betke K., Savelsberg B. (1950)
Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämoglobin.
Biochemische Zeitschrift 320, 431-439.
05. Blackmore P.F., Bramley F., Marks J.L.,
Exton J.H. (1978)
Studies on α -adrenergic activation of hepatic glucose output.
Journal of Biological Chemistry 253 (14), 4851-4858.

06. Braunwald E. (1982)

Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents.

The New England Journal of Medicine 26, 1618.

07. Chick T.W. (1986)

The effect of Nifedipine on cardiopulmonary responses during exercise in normal subjects.

Chest 89, 641-646.

08. Dabrowska R., Aromatorio D., Sherry J.M.F.,
Hartshorne D.J. (1977)

Composition of the myosin light chain kinase from chicken gizzard.

Biochemical and Biophysical Research
Communications 78, 1263-1272.

09. Dabrowska R., Hartshorne D.J. (1978)

A Ca^{2+} - and modulator-dependant myosin light chain kinase from non-muscle cells.

Biochemical and Biophysical Research
Communications 85, 1352-1359.

10. Dabrowska R., Sherry J.M.F., Aromatorio D.,
Hartshorne D.J. (1978)

Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from chicken gizzard.

Biochemistry 17, 253-258.

11. Daniel S.S., Stark R.J., Zubrow A.B., Fox H.E.,
Husain H.K., James L.S. (1983)
Factors in the release of vasopressin by the
hypoxic fetus.
Endocrinology 113, 1623-1632.
12. Defer G., Guezennec Y.C., Lhoste F. (1986)
Effect of Nifedipine on plasma catecholamines in
man at rest and during exercise.
European Journal of Clinical Pharmacology 30,
727-729.
13. De Witt L.M., Putney J.W. (1983)
Stimulation of glycogenolysis in hepatocytes by
angiotensin II may involve both calcium release
and calcium influx.
FEBS letters 160, 259-262.
14. Duncker H.R. (1978)
Development of the avian respiratory and circula-
tory systems.
In: Respiratory function in birds, adult and
embryonic, Piiper J. (ed.),
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York,
260-273.

15. Eckert R., Chad J.E. (1984)
Inactivation of Ca channels.
Progress in Biophysics and Molecular Biology 44,
215-267.
16. England P.J. (1986)
Intracellular calcium receptor mechanisms.
British Medical Bulletin 42, 375-383.
17. Freeman B.M. (1969)
The mobilization of hepatic glycogen in Gallus
domesticus at the end of incubation.
Comparative Biochemistry and Physiology 28,
1169-1176.
18. Freeman B.M., Manning A.C. (1971)
Glycogenolysis and lipolysis in Gallus domesticus
during the perinatal period.
Comparative and General Pharmacology 2, 198-204.
19. Freeman B.M., Mission B.H. (1970)
pH, pO₂ and pCO₂ of blood from the foetus and
neonate of Gallus domesticus.
Comparative Biochemistry and Physiology 33,
763-772.

20. Goto M. (1984)

Effects of cellular Ca^{2+} depletion on phospholipid turnover and glycogen phosphorylase a in rat hepatocytes.

Japanese Journal of Experimental Medicine 54, 109-115.

21. Graham A.D.M., Longo L.D., Cheung C.Y. (1986)

Catecholamine secretion from the adrenal medulla of the fetus, regulation by hormones.

Journal of Developmental Physiology 8, 227-235.

22. Greengard O., Thorndike J. (1974)

Changing enzyme patterns in chick organs during development.

Enzyme 17, 333-378.

23. Grün A., Fleckenstein G. (1972)

Die elektromechanische Entkoppelung der glatten Gefäßmuskulatur als Grundprinzip der Coronardilatation durch 4-(2'-Nitrophenyl)2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester (BAYa 1040, Nifedipin).

Arzneimittelforschung 22, 334-336.

24. Guder W.L., Wieland O. (1969)
Triglyceride breakdown in rat liver. The demonstration of three different lipases.
Biochimica et Biophysica Acta 187, 173-185.
25. Haddy F.J., Scott J.B. (1968)
Metabolically linked vasoactive chemicals in local regulation of blood flow.
Physiological Review 48, 688-707.
26. Harrison T.S., Birbari A., Seaton J.F. (1973)
Reinforcement of reflux epinephrine release by angiotensin.
American Journal of Physiology 224, 31-36.
27. Hedquist P., Fredholm B.B. (1976)
Effects of adenosine on adrenergic neurotransmission; prejunctional inhibition and postjunctional enhancement.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 293, 217-223.
28. Hems D.A., Ismail N.A. (1978)
Effects of adenosine on glucose and lipid metabolism and hepatic blood flow.
Biochemical Pharmacology 27, 1341-1345.

29. Hems D.A., Whitton P.D. (1980)
Control of hepatic glycogenolysis.
Physiological Reviews 60, 1-50.
30. Hoffer L.J., Lowenstein J.M. (1986)
Effects of adenosine and adenosine analogues on
glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes.
Biochemical Pharmacology 35, 4529-4536.
31. Hohorst H.J. (1970)
In: Methoden der enzymatischen Analyse,
Bergmeyer H.U. (ed.),
Verlag Chemie Weinheim, 1425-1429.
32. Ignarro L.J., Shideman F.E. (1968)
Catechol-O-Methyltransferase and Monoamino-
oxidase activities in the heart and liver of
the embryonic and developing chick.
Journal of Pharmacology and Experimental Thera-
peutics 159, 29-37.
33. Jungermann K., Möhler H. (1980)
Biochemie,
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

34. Keppens S., Vandenheede J.R., de Wulf H. (1977)
On the role of calcium as second messenger in
liver for the hormonally induced activation
of glycogen phosphorylase.
Biochimica et Biophysica Acta 496, 448-457.
35. Lamprecht W., Trautschold D. (1970)
In: Methoden der enzymatischen Analyse,
Bergmeyer H.U. (ed.),
Verlag Chemie Weinheim, 2024-2033.
36. Lederballe O., Pederson E. (1980)
Acute effects of nifedipine.
Journal of Cardiovascular Pharmacology 2, 360-364.
37. Levin D.L., Mills L.J., Parkey M. (1979)
Constriction of the fetal ductus arteriosus after
administration of indomethacin to the pregnant ewe.
Journal of Pediatrics 94, 647-650.
38. Levitt M., Spector S., Sjoerdsma A.,
Udenfried S. (1965)
Elucidation of the rate-limiting step in norepi-
nephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig
heart.
Journal of Pharmacology and Experimental
Therapeutics 148, 1-8.

39. Mellins R.B., Davidson D., Stalcup S.A. (1980)
Non-respiratory functions of the lung in the
perinatal period.
In: Excerpta Medica.
Ciba Foundation Symposium, Bd. 78, 313-331,
Elsevier, Amsterdam.
40. Nakagawa Y., Gudenzi M., Mustafa S.J. (1986)
Calcium entry blocking activity of adenosine
potentiating compounds in guinea pig taenia coli.
Pharmacological Research Communications 18, 349-365.
41. Palm D., Hellenbrecht D., Quiring K. (1983)
In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und
Toxikologie,
Forth W., Henschler D., Rummel W. (eds.),
Bibliographisches Institut Mannheim, Wien,
Zürich, 112-155.
42. Peach M.J. (1971)
Adrenal medullary stimulation induced by
angiotensin I, angiotensin II and analogues.
Circulation Research (Suppl. II) 28-29, 107-123.
43. Prechtel J. (1988)
Bestimmung und Funktion der Katecholamine in der
spätembryonalen Phase des Hühnerküchens.
Med. Vet. Diss., München.

44. Rahn H., Paganelli C.V., Ar A. (1974)
The avian egg: Air-cell gas tension, metabolism
and incubation time.
Respiration Physiology 22, 297-309.
45. Rahn H., Paganelli C.V., Ar A. (1979)
How bird eggs breathe.
Scientific American 240, 46-55.
46. Rodbell M., Birnbauer L. (1971)
The glucagon-sensitive adenylyl-cyclase system in
plasma membranes of rat liver: an obligatory role
of guanyl nucleotides in glucagon action.
Journal of Biological Chemistry 246, 1877-1882.
47. Romanoff A.L. (1967)
Biochemistry of the avian embryo.
John Wiley, New York.
48. Rudolph A.M., Heymann M.A. (1970)
Circulatory changes during growth in the fetal lamb.
Circulation Research 26, 289-299.
49. Saller R., Berger Th., Ulmer E.M.,
Hellenbrecht D. (1983)
In: Praktische Pharmakologie,
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 370-372.

50. Schmidt M. (1987)

Über den Glykogenstoffwechsel der Leber und des Dottersackes beim Hühnerembryo.

Med. Vet. Diss., München.

51. Scott J.B., Daugherty R.M., Dabney J.M.,
Haddy F.J. (1965)

Role of chemical factors in regulation of blood flow through kidney, hindlimb and heart.

American Journal of Physiology 208, 813-824.

52. Stanfield P.R. (1986)

Voltage dependant calcium channels of excitable membranes.

British Medical Bulletin 42 (4), 359-367.

53. Starck D. (1975)

Embryologie, 3. Auflage,

Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

54. Stone T.W. (1982)

Interactions of adenosine with other agents.

In: Regulatory function of adenosine,

Berne R.M. (ed.),

Proceedings of the International Symposium on Adenosine, 467-477.

55. Tazawa H. (1971)
Measurement of respirator parameters in blood of chicken embryo.
Journal of Applied Physiology 30, 17-20.
56. Thomas R.C., Just J.J. (1964)
Endocrine control of yolk sac membrane glycogen levels in the developing chick embryo.
General and Comparative Endocrinology 4, 614-623.
57. Vaghy P.L., Williams M.D., Schwartz J.S. (1987)
Receptor pharmacology of calcium entry blocking agents.
American Journal of Cardiology 59 (2), 9A-17A.
58. Visschedijk A.H.J. (1968)
Air space and embryonic respiration. I. The pattern of gaseous exchange in the fertile egg during the dosing stages of incubation.
British Poultry Science 9, 173-184.
59. Visschedijk A.H.J. (1968)
The air space and embryonic respiration. II. The times of pipping and hatching as influenced by an artificially changed permeability of the shell over the air space.
British Poultry Science 9, 185-196.

60. Walsh M.P., Hartshorne D.J. (1982)
Actomyosin of smooth muscle.
In: Calcium and Cell Function 3, 223-269.
61. Weißenbeck J.S. (1981)
Der Einfluß der Gaszusammensetzung der Luftkammer
auf das Schlupfgeschehen und den Leberstoffwechsel
des Kükenembryos.
Med. Vet. Diss., München.
62. Wittmann J. (1987)
Respiratorische und nichtrespiratorische Funktionen
der Lunge.
Tierärztliche Praxis, Suppl. 2, 33-36.
63. Wittmann J., Weiss A. (1980)
Studies on the metabolism of glycogen and adenine
nucleotides in embryonic chick liver at the end
of incubation.
Comparative and Biochemical Physiology 69C, 1-6.



Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Wittmann für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Für die Bereitstellung des Blutgas-Analysators möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Kraft, I. Medizinische Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, bedanken.

Ebenso danke ich Frau B. Hofer und allen anderen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit behilflich waren.

LEBENS LAUF

- 27.08.1959 Geboren in Wiggensbach als Sohn von
Anton und Karolina Bischofberger,
geb. Reisacher
- 1966 - 1970 Grundschule in Altusried
- 1970 - 1979 Allgäu-Gymnasium in Kempten
- 27.06.1979 Allgemeine Hochschulreife
- 1979 - 1981 Wehrdienst
- 1981 - 1982 Arbeiter beim Allgäuer Emmentalerwerk
Kimratshofen
- 1982 - 1987 Studium der Tiermedizin an der Lud-
wig-Maximilians-Universität München
- 08.01.1988 Approbation zum Tierarzt
- seit Dez. 1987 Anfertigung der vorliegenden Disser-
tation

